

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JOELLE DE MELO TURNES

**INEFICÁCIA DA SAXAGLIPTINA COMO DROGA NEUROPROTETORA EM
RATOS LESADOS PELA 6-OHDA**

CURITIBA

2016

JOELLE DE MELO TURNES

**INEFICÁCIA DA SAXAGLIPTINA COMO DROGA NEUROPROTETORA EM
RATOS LESADOS PELA 6-OHDA**

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre em Farmacologia, no
Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Setor
de Ciências Biológicas, Universidade Federal do
Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria A.B.F. Vital

CURITIBA

2016

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Turnes, Joelle de Melo
Ineficácia da saxagliptina como droga neuroprotetora em ratos
lesados pela 6-OHDA. / Joelle de Melo Turnes. – Curitiba, 2016.
47 f.: il. ; 30cm.

Orientadora: Profa. Dra. Maria A. B. F. Vital

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor
de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação Farmacologia.

1. Parkinson, Doença de. 2. Farmacologia. I. Título. II. Vital,
Maria Aparecida Barbato Frazão. III. Universidade Federal do
Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação
em Farmacologia.

CDD (22. ed.) 615.10724



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Programa de Pós Graduação em FARMACOLOGIA
Código CAPES: 40001016038P0

ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM FARMACOLOGIA

No dia trinta de Novembro de dois mil e dezesseis às 09:00 horas, na sala 107 - Anfiteatro, Anexo I, do Setor de CIÊNCIAS BIOLÓGICAS da Universidade Federal do Paraná, foram instalados os trabalhos de arguição da mestranda **JOELLE DE MELO TURNES** para a Defesa Pública de sua Dissertação intitulada: "**A SAXAGLIPTINA TEM EFEITOS NEUROPROTETORES EM RATOS LESADOS PELA 6-OHDA?**". A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: MARIA APARECIDA BARBATO FRAZÃO VITAL (UFPR), BRUNO JACSON MARTYNHAK (UFPR), ROBERTO ANDREATINI (UFPR). Dando início à sessão, a presidência passou a palavra a discente, para que a mesma expusesse seu trabalho aos presentes. Em seguida, a presidência passou a palavra a cada um dos Examinadores, para suas respectivas arguições. A aluna respondeu a cada um dos arguidores. A presidência retomou a palavra para suas considerações finais e, depois, solicitou que os presentes e a mestranda deixassem a sala. A Banca Examinadora, então, reuniu-se sigilosamente e, após a discussão de suas avaliações, decidiu-se pela **APROVADA** da aluna. A mestranda foi convidada a ingressar novamente na sala, bem como os demais assistentes, após o que a presidência fez a leitura do Parecer da Banca Examinadora. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, MARIA APARECIDA BARBATO FRAZÃO VITAL, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos membros da Comissão Examinadora.

Curitiba, 30 de Novembro de 2016.

MARIA APARECIDA BARBATO FRAZÃO VITAL
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

BRUNO JACSON MARTYNHAK
Avaliador Externo (UFPR)

ROBERTO ANDREATINI
Avaliador Interno (UFPR)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Programa de Pós Graduação em FARMACOLOGIA
Código CAPES: 40001016038P0

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **JOELLE DE MELO TURNES**, intitulada: "**A SAXAGLIPTINA TEM EFEITOS NEUROPROTETORES EM RATOS LESADOS PELA 6-OHDA?**", após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVADA.

Curitiba, 30 de Novembro de 2016.

MARIA APARECIDA BARBATO FRAZÃO VITAL
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

BRUNO JACSON MARTYNHAK
Avaliador Externo (UFPR)

ROBERTO ANDREATINI
Avaliador Interno (UFPR)

AGRADECIMENTOS

Ao meu marido amado, pelas horas me ouvindo treinar para apresentações, pelos conselhos, ajuda em estatística, por tornar meu trabalho mais leve e a minha vida muito mais feliz

A meu pai, por saber em que eu queria trabalhar antes de mim, por sempre me apoiar e me ajudar nos meus estudos, e, principalmente pelo amor e carinho

A minha mãe, pelos conselhos, apoio, por sempre acreditar em mim e por seu amor incondicional

A minha orientadora Prof^a. Dr^a. Maria Vital por sua orientação, pelos conselhos, ensinamentos, honestidade e por sempre me tratar com paciência e carinho.

As minhas amigas queridas, pelos momentos de descontração e alegria

A Taysa Bassani pela amizade, apoio, ensinamentos, pelos valiosos conselhos, auxílio na realização dos experimentos e sua paciência em me ajudar.

Aos colegas da farmacologia, pelo suporte e descontração em vários momentos

Aos funcionários do setor, em especial a farmacêutica Silvia Genari pela paciência e dedicação.

Aos funcionários do Biotério Central pela ajuda e disponibilidade.

A cada um dos animais utilizados nos experimentos.

Aos membros da banca pelo aceite e disponibilidade.

A CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

Existe um interesse crescente na investigação de um fármaco hipoglicêmico para o tratamento da Doença de Parkinson (DP), uma vez que foram verificados mecanismos em comum entre DP e Diabetes Mellitus (DM) e vários desses compostos mostraram potenciais efeitos neuroprotetores, dentre eles a classe dos inibidores dipeptidil peptidase-4 (DPP-4). Portanto, o presente estudo investigou os efeitos da saxagliptina (inibidor DPP-4) na função motora utilizando os testes do campo aberto (CA) e rotarod (RT), e na cognição por meio do teste de reconhecimento de objetos (RDO) no modelo animal de DP induzido por 6-hidroxidopamina (6-OHDA) em ratos. Os animais receberam uma infusão bilateral de 6-OHDA na substância negra (SN) e, após 24 horas, iniciou-se o tratamento com Saxagliptina (1 mg/kg, v.o.) uma vez ao dia, durante 21 dias. A lesão nigrostriatal promoveu hipolocomoção no CA e RT, comprometimento da memória no teste de RDO e também redução dos neurônios imunorreativos à tirosina hidroxilase (TH-ir). No entanto a saxagliptina não melhorou a função motora e, surpreendentemente, a droga promoveu prejuízo cognitivo. Nossos resultados indicam que o tratamento com saxagliptina não foi capaz de reverter o prejuízo produzido pela 6-OHDA nos testes analisados, além de ter prejudicado a memória dos animais neste modelo. Portanto, são necessários mais estudos para elucidar os efeitos destes fármacos em modelos animais da DP e especialmente os seus efeitos na memória a fim de esclarecer se as diferenças entre as gliptinas podem resultar em efeitos farmacológicos distintos ou se estas diferenças são relativas à particularidade deste modelo de DP.

Palavras-chave: Doença de Parkinson; GLP-1; inibidores DPP-4; Saxagliptina; teste de reconhecimento de objetos; 6-OHDA.

ABSTRACT

There is a growing interest in the investigation of a hypoglycemic agent for the treatment of Parkinson's disease (PD), because common mechanisms between PD and Diabetes Mellitus (DM) have been reported. In addition, several hypoglycemic drugs have showed potential neuroprotective effects. A class of these drugs is composed by the dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) inhibitors. Therefore, the present study investigated the effects of saxagliptin (DPP-4 inhibitor) in motor function using the open field (OFT) and rotarod tests. Moreover, cognition was evaluated using the novel object recognition test (NOR) in the animal model of PD induced by 6-hydroxydopamine (6-OHDA) in rats. Animals received a bilateral infusion of 6-OHDA in the substantia nigra (SN) and, after 24 hours, they started to receive treatment with Saxagliptin (1 mg/kg, p.o.) once daily, for 21 days. The nigrostriatal injury promoted a hypolocomotion in the OFT and rotarod, memory impairment in the NOR test and also a reduction of tyrosine hydroxylase immunoreactive (TH-ir) neurons. However, saxagliptin did not improve motor function and, surprisingly, the drug promoted cognitive decline. Therefore, our results indicate that treatment with saxagliptin was unable to reverse the impairment produced by 6-OHDA in the tests analyzed. Additionally, the drug worsened the memory of animals in this model. Thus, more studies are needed to elucidate the effects of these drugs in PD animal models and especially its effects in memory to clarify if differences between gliptins may result in distinct pharmacological effects or if these differences are relative to the particularity of this PD model.

Keywords: Parkinson's disease; GLP-1; dpp-4 inhibitors; Saxagliptin; novel object recognition test; 6-OHDA.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – NEUROPATOLOGIA DA DOENÇA DE PARKINSON.	11
FIGURA 2 - MECANISMO DE AÇÃO DA 6-OHDA.	16
FIGURA 3 – EFEITOS DO <i>GLUCAGON-LIKE PEPTIDE</i> (GLP-1) NO ORGANISMO.	18
FIGURA 4 – VIAS ENVOLVIDAS NA ATIVAÇÃO DOS RECEPTORES GLP-1.	20
FIGURA 5 – MECANISMO DE AÇÃO DOS INIBIDORES DPP-4.	23
FIG. 6 EXPERIMENTAL DESIGN.	30
FIG. 7 EFFECT OF TREATMENT WITH SAXAGLIPTIN ON BODY WEIGHT.	34
FIG. 8 EFFECT OF TREATMENT WITH SAXAGLIPTIN ON LOCOMOTOR ACTIVITY IN THE OPEN FIELD TEST.	34
FIG. 9 EFFECT OF TREATMENT WITH SAXAGLIPTIN ON MOTOR-LEARNING IN THE ROTAROD TEST, AFTER INDUCTION OF THE PD ANIMAL MODEL WITH 6-OHDA.	35
FIG. 10 EFFECT OF TREATMENT WITH SAXAGLIPTIN ON THE DISCRIMINATION INDEX (D2) FOR THE OBJECTS DURING THE NOVEL OBJECT RECOGNITION TASK.	36
FIG. 11 EFFECT OF TREATMENT WITH SAXAGLIPTIN IN THE LOSS OF TYROSINE HYDROXYLASE IMMUNOREACTIVE (TH-IR) NEURONS IN THE SNPC OF THE RATS.	36
FIG. 12 EFFECT OF TREATMENT WITH SAXAGLIPTIN IN THE PERCENT LOSS OF TYROSINE HYDROXYLASE IMMUNOREACTIVE (TH-IR) NEURONS IN THE SNPC	37

LISTA DE ABREVIATURAS

6-OHDA	- 6-hidroxidopamina
AMP _c	- Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
AC	- Adenilil ciclase
AD	- Doença de Alzheimer
AKT	- Proteína quinase B
BHE	- Barreira hemato-encefálica
CA	- Campo aberto
CREB	- Proteína de ligação ao elemento de resposta de AMP _c
DA	- Dopamina
DM	- Diabetes Mellitus
DP	- Doença de Parkinson
DPP-4	- Dipeptidil peptidase-4
GEF	- Fatores de troca AMP _c -guanina-nucleótideo
GLP-1	- <i>Glucagon-like peptide</i>
MAPK/ERK	- Proteína-quinases ativadas por mitógeno regulada por sinal extracelular
MPO	- Mieloperoxidase
MPTP	- 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetra-hidropiridina
PKA	- Proteína quinase A
PI3K	- Fosfoinosítideo 3-quinase
RDO	- Reconhecimento de objetos
SN	- Substância negra
SN _{pc}	- Substância negra parte compacta
TH	- Tirosina hidroxilase
VTA	- Área ventral tegumentar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO À DOENÇA DE PARKINSON	10
2	REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1	DOENÇA DE PARKINSON	12
2.1.1	<i>Patogênese e etiologia da doença</i>	12
2.1.2	<i>Sinais e sintomas</i>	13
2.1.3	<i>Tratamento farmacológico</i>	13
2.1.4	<i>Déficits cognitivos na DP</i>	14
2.1.5	<i>Modelo animal da DP induzido por 6-OHDA</i>	15
2.2	PARKINSON E DIABETES MELLITUS TIPO 2	17
2.2.1	<i>Glucagon-like peptide (GLP-1)</i>	18
2.2.2	<i>Agonistas GLP-1</i>	20
2.2.3	<i>Dipeptidil peptidase-4 (DPP-4)</i>	21
2.2.4	<i>Inibidores DPP-4</i>	22
2.2.5	<i>Saxagliptina</i>	23
3	OBJETIVOS	25
3.1	OBJETIVO GERAL	25
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
4	ARTIGO CIENTÍFICO	25
4.1	ABSTRACT	27
4.2	INTRODUCTION	28
4.3	MATERIAL AND METHODS	29
4.3.1	<i>Animals</i>	29
4.3.2	<i>Drugs</i>	29
4.3.3	<i>Experimental design</i>	30
4.3.4	<i>Stereotaxic surgery</i>	30
4.3.5	<i>Open field test</i>	31
4.3.6	<i>Rotarod test</i>	31
4.3.7	<i>Novel object recognition test</i>	32
4.3.8	<i>Immunohistochemistry staining for Tyrosine hydroxylase (TH)</i>	32

4.3.9	<i>Statistics</i>	33
4.4	RESULTS.....	33
4.4.1	<i>Body weight</i>	33
4.4.2	<i>Open field test</i>	34
4.4.3	<i>Rotarod test</i>	35
4.4.4	<i>Novel object recognition test</i>	35
4.4.5	<i>Immunohistochemistry staining for Tyrosine hydroxylase (TH)</i>	36
4.5	DISCUSSION.....	37
4.6	CONCLUSION	39
4.7	ACKNOWLEDGMENTS	40
5	CONCLUSÃO	41
	REFERÊNCIAS.....	42
	ANEXO 1 – CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DA UFPR.....	49

1 INTRODUÇÃO À DOENÇA DE PARKINSON

A Doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa crônica progressiva, com implicações físicas, psicológicas e sociais (WORTH, 2013). Caracteriza-se pela perda de neurônios dopaminérgicos que se projetam da substância negra *pars compacta* (SNpc) para o estriado e presença de depósitos de α -sinucleína, parkina e ubiquitina em várias regiões mesencefálicas, também conhecidos como corpúsculos de Lewy (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003a). Essa perda neuronal ocasiona uma redução da dopamina (DA) estriatal e, consequentemente, desenvolvimento dos sinais motores clássicos da DP (SINGH et al., 2007; HIRSCH et al., 2012; SCHINTU et al., 2012).

Classificada como segunda doença neurodegenerativa mais frequente no mundo, é uma importante causa de incapacidade crônica (SCHINTU et al., 2012). A idade é considerada o principal fator de risco para o desenvolvimento da doença (OBESO et al., 2010) e estima-se que afeta 1-2% da população acima de 65 anos, tendo seu início médio aos 60 anos (LEES et al., 2009; REICHMANN et al., 2009; SCHAPIRA, 2009). Além disso, a prevalência e incidência aumentam exponencialmente com a idade, sendo uma doença de grande preocupação pois a população mundial está envelhecendo e a expectativa de vida está cada vez maior. Estima-se que o número de pessoas com a doença aumente mais que 50% até 2030 (KALIA; LANG, 2015).

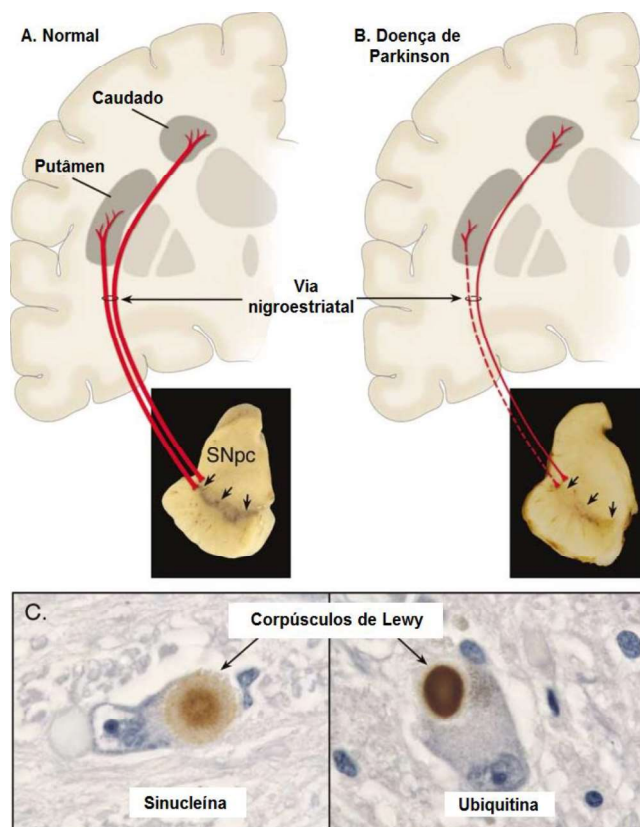
Além da idade, fatores de risco relacionados com a doença são a exposição à pesticidas, traumatismo craniano prévio, vida rural, uso de β -bloqueadores, emprego na área agrícola e consumo de água de poço. Os fatores ambientais associados à diminuição do risco incluem o tabagismo, consumo de café, uso de antiinflamatórios não esteroides, uso de bloqueadores de canais de cálcio e consumo de álcool (KALIA; LANG, 2015).

Os neurônios dopaminérgicos presentes na SNpc contêm grandes quantidades de neuromelanina que promove uma coloração escura nessa estrutura do mesencéfalo. A perda desses neurônios acarreta em despigmentação da SNpc que constitui um achado neuropatológico clássico da doença (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003b), como pode ser observado na FIGURA 1. O diagnóstico padrão ouro da doença é a presença de degeneração da SNpc e presença de

corpúsculos e neuritos de Lewy em exames patológicos *post-mortem* (KALIA; LANG, 2015).

A DP era considerada anteriormente como uma doença somente motora, no entanto crescentes evidências tem demonstrado que existe um envolvimento de sistemas não dopaminérgicos que desencadeiam os sinais não motores (KALIA; LANG, 2015).

FIGURA 1 – Neuropatologia da Doença de Parkinson. A via nigroestriatal está representada em vermelho, onde os corpos celulares dos neurônios dopaminérgicos estão localizados na substância negra parte compacta (SNpc) e se projetam para o estriado (caudado e putâmen). (A) representação da via nigroestriatal em um indivíduo saudável. (B) representação da via nigroestriatal em um indivíduo com a doença de Parkinson, onde observa-se uma perda dos neurônios dopaminérgicos. A SNpc possui uma pigmentação naturalmente marrom escura, produzida pela neuromelanina dentro dos neurônios dopaminérgicos (A), na doença de Parkinson ocorre uma despigmentação da SNpc como pode ser observado em (B). (C) Marcação imuno-histoquímica de inclusões intra-neuronais, denominadas corpos de Lewy, num neurônio dopaminérgico de SNpc. a- sinucleína (fotografia esquerda), ubiquitina (fotografia direita).



FONTE: Adaptado de DAUER; PRZEDBORSKI (2003a).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DOENÇA DE PARKINSON

2.1.1 Patogênese e etiologia da doença

O desenvolvimento da doença envolve interações complexas entre fatores genéticos e ambientais. Em 95% dos casos de DP, sua origem não possui envolvimento genético, conhecida como DP esporádica. No entanto, nos casos restantes a doença é hereditária (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003a; KALIA; LANG, 2015).

Com relação a DP de origem genética, as mutações em LRRK2 e parkina são as causas mais frequentes da Doença de Parkinson hereditária dominante e recessiva, respectivamente (KALIA; LANG, 2015).

A origem da DP ainda não foi totalmente elucidada, mas vários mecanismos celulares foram propostos como a disfunção mitocondrial, estresse oxidativo, apoptose, acúmulo de agregados proteicos e inflamação. Além disso, excitotoxicidade, a produção de espécies reativas de oxigênio e a apoptose podem contribuir significativamente para a degeneração da célula neuronal (REKAİK et al., 2015).

A neuropatologia da DP envolve muito mais do que o sistema dopaminérgico nigroestriatal, incluindo áreas que não estão diretamente envolvidas com o controle motor. Dentre essas áreas temos o sistema mesolímbico dopaminérgico, neurônios noradrenérgicos no *locus coeruleus* e neurônios serotoninérgicos no núcleo da rafe, neurônios colinérgicos nos núcleos basais de Meynert, o núcleo vagal dorsal, o tubérculo olfatório e grandes partes do córtex límbico e neocórtex. Mudanças nesses sistemas podem levar ao desenvolvimento dos sinais e sintomas não-motores da DP (SCHINTU et al., 2012; SVENNINGSSON et al., 2012)

2.1.2 Sinais e sintomas

Os sinais motores clássicos da doença foram primeiramente descritos por James Parkinson em 1817, que incluem bradicinesia (lentidão dos movimentos), rigidez muscular (resistência aumentada dos movimentos passivos dos membros) e tremor em repouso. Essas alterações levam a manifestação de diversas características, como falta de expressão facial normal, diminuição do tom de voz, dificuldade de engolir, diminuição do tamanho e velocidade da escrita. Além disso, os pacientes normalmente apresentam uma postura curvada, levando a perda de reflexos e causando quedas. Disfunções cognitivas e depressão ocorrem frequentemente e a demência é bastante comum na DP, principalmente em pacientes com idade mais avançada (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003b).

No início do aparecimento dos sinais motores, a DA estriatal já se encontra depletada em aproximadamente 80% e aproximadamente 60% dos neurônios dopaminérgicos da SNpc estão comprometidos. Os neurônios dopaminérgicos mesolímbicos presentes na área tegumentar ventral (VTA), são menos afetados na DP do que nas outras regiões citadas (DAUER, PRZEDBORSKI, 2003a).

Cerca de 90% dos pacientes com DP apresentam sinais não-motores durante o curso da doença que promovem um alto impacto na sua qualidade de vida (WORTH, 2013). Há evidências crescentes de que esses sinais e sintomas não-motores (disfunção olfatória, anormalidades do sono, desnervação simpática cardíaca, constipação, depressão e dor) podem aparecer 10 anos antes dos sinais motores da doença de Parkinson (OBESO et al., 2010; KALIA; LANG, 2015). Nos estágios mais avançados da doença a constipação, incontinência urinária, disfunção olfatória e hipotensão postural são mais frequentes.

2.1.3 Tratamento farmacológico

Mesmo após aproximadamente 200 anos desde a primeira descrição da DP, ainda não existe um tratamento capaz de impedir a perda neuronal ou mesmo

prevenir o desenvolvimento da doença (OERTEL; SCHULZ, 2016). As atuais terapias para a doença de Parkinson atuam controlando os sinais da doença, tendo como principal alvo o sistema dopaminérgico, ou seja, são mais voltados para os sinais motores (KALIA; LANG, 2016). As drogas dopaminérgicas melhoram significativamente os sinais dependentes de dopamina como o tremor, rigidez e acinesia, especialmente nos estágios iniciais da doença (OBESO et al., 2010). Porém, a L-DOPA quando utilizada a longo prazo, é associada a várias complicações motoras (flutuações do motoras, estados "ON" para "OFF" e discinesias) (OERTEL; SCHULZ, 2016). Ademais, os tratamentos para os sinais e sintomas que ocorrem em estágios mais avançados da doença são escassos e/ou ineficientes, como os sinais motores que não respondem as terapias dopaminérgicas e principalmente os sinais não motores como distúrbios autonômicos e prejuízo cognitivo (OBESO et al., 2010; KALIA; LANG, 2016). Em pacientes com déficit cognitivo, por exemplo, os agonistas dopaminérgicos podem induzir alucinações ou piorar as alucinações já existentes (OERTEL; SCHULZ, 2016).

2.1.4 Déficits cognitivos na DP

Os tratamentos e mecanismos que envolvem os sinais e sintomas não-motores como o déficit cognitivo começaram a ser estudados recentemente. Infelizmente, a deterioração das funções executivas, tais como atenção, planejamento, formação de conceitos, memória de reconhecimento, memória de trabalho e resolução de problemas, muitas vezes aparecem na fase pré-motora da doença e progressivamente aumentam de intensidade, afetando negativamente a qualidade de vida de 50%-60% dos pacientes com DP (SOLARI et al., 2013). Ademais, a apatia, ansiedade e depressão estão associados ao prejuízo cognitivo (PAGONABARRAGA; KULISEVSKY, 2012).

A deterioração da memória afeta tanto os domínios espaciais como não espaciais da memória de trabalho, memória implícita, memória episódica e da aprendizagem processual, enquanto a capacidade de formar novas memórias episódicas é preservada. Os déficits na percepção visual e no reconhecimento de

objetos (subtipo da memória declarativa) também são frequentemente relatados como um dos primeiros sinais em pacientes com DP, independentemente das disfunções motoras, complicações neuropsiquiátricas (SOLARI et al., 2013; COHEN; STACKMAN, 2015). A variedade das disfunções cognitivas atrapalha o diagnóstico clínico e a etiopatologia do prejuízo cognitivo na DP ainda não é totalmente elucidada. Todavia, podem estar relacionadas com disfunção de outras estruturas cerebrais como no córtex pré-frontal, hipocampo, amígdala e há um consenso de que as perturbações nos sistemas monoaminérgicos mesocorticais desempenham um papel importante (LINDGREN; DUNNETT, 2012).

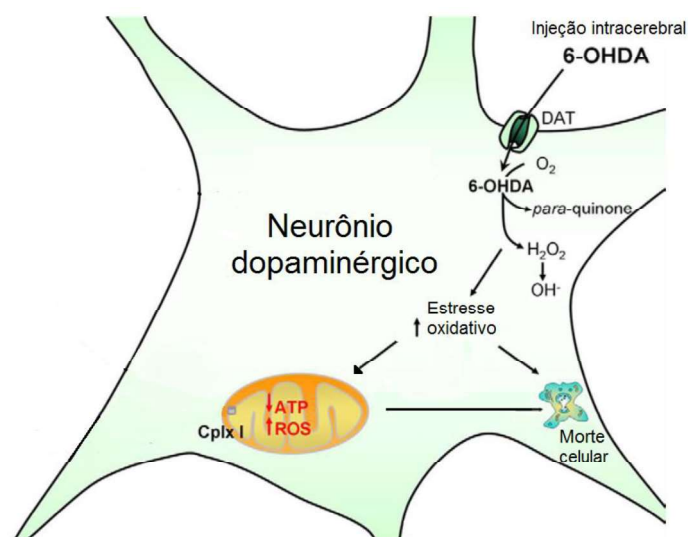
2.1.5 Modelo animal da DP induzido por 6-OHDA

A 6-hidroxidopamina (6-OHDA) foi a primeira toxina utilizada como modelo animal associado com a morte de neurônios dopaminérgicos da SNpc (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003b). Essa neurotoxina apresenta uma estrutura química muito semelhante ao neurotransmissor dopamina. Devido a essa semelhança, possui alta afinidade pelos transportadores de catecolaminas e através deles é transportada para o interior do neurônio (BOVÉ; PERIER, 2012). A 6-OHDA é uma substância muito eletroreativa e rapidamente se oxida em vários compostos citotóxicos como quinonas, peróxido de hidrogênio, radicais superóxidos e radicais hidroxila, os quais danificam os neurônios, afetando proteínas, membranas lipídicas e DNA (SCHWARTING, 1996; DAUER; PRZEDBORSKI, 2003b). A neurotoxina promove também a inibição do complexo I da cadeia transportadora de elétrons ocasionando a morte dos neurônios dopaminérgicos conforme demonstra a FIGURA 2 (DUTY; JENNER, 2011). Como a 6-OHDA não atravessa a barreira hemato-encefálica (BHE), necessita-se que a injeção seja realizada diretamente no cérebro. Os locais normalmente utilizados para a injeção são o estriado, a SNpc e o feixe prosencefálico medial. Se injetada nesses dois últimos sítios, a neurodegeneração começa em 24 horas e apresenta uma morfologia não apoptótica (BOVÉ; PERIER, 2012). Os neurônios dopaminérgicos na VTA praticamente não são afetados, semelhante à perda de DA que ocorre na DP (MEREDITH et al., 2008). Quando

injetada na substância negra (SN) os neurônios que se projetam para o estriado são os mais afetados e causam uma degeneração anterógrada dos neurônios dopaminérgicos nigroestriatais (SCHWARTING; HUSTON, 1996; BERTOLINO et al., 2013). O período inicial após a injeção da substância, é caracterizado por neurônios DA disfuncionais, ou seja, ainda produzem dopamina mas não a liberam em quantidade suficiente nos terminais pós sinápticos (SCHWARTING, 1996). Posteriormente, os níveis de DA e seus neurônios decaem até cessarem completamente, fato que ocorre na SN normalmente entre os 4º e 6º dias após a injeção e mantendo essa perda por 2 a 4 semanas (SCHWARTING, 1996; MEREDITH et al., 2008). Apesar disso, pode não ocorrer uma perda total desses neurônios dependendo da dose utilizada e do sítio de injeção (SCHWARTING; HUSTON, 1996). No entanto, esse modelo animal não promove a formação de corpúsculos de Lewy e não mimetiza a progressão dopaminérgica progressiva característica da DP (MEREDITH et al., 2008; SOLARI et al., 2013).

A infusão bilateral da 6-OHDA tem sido aplicada para o estudo de sinais e sintomas não motores da doença, a fim de evitar efeitos compensatórios do lado não lesado para o lesado e comprometer o desempenho nos testes comportamentais (SANTIAGO et al., 2010, 2014, 2015; SOLARI et al., 2013).

FIGURA 2 - Mecanismo de ação da 6-OHDA. A 6-OHDA é transportada pelo DAT para dentro do neurônio e se autooxida, gerando espécies reativas de oxigênio. O estresse oxidativo gerado inibe o complexo I (Cpl I) da cadeia respiratória da mitocôndria promovendo a morte celular.
(Adaptado de BOVÉ; PERIER, 2012).



FONTE: Adaptado de BOVÉ; PERIER(2012).

2.2 PARKINSON E DIABETES MELLITUS TIPO 2

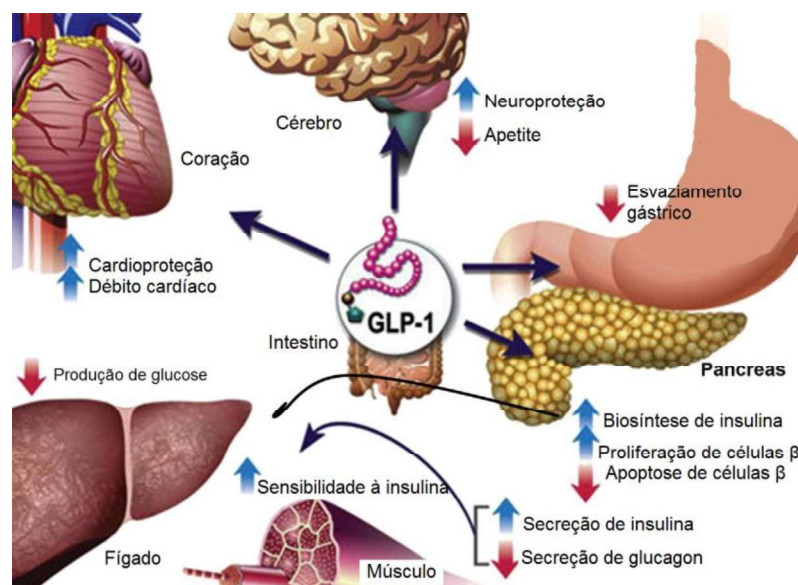
Uma possível ligação entre a Diabetes Mellitus (DM) e a DP começou a ser considerada quando pesquisadores, cerca de 20 anos atrás, sugeriram que a resistência à insulina acelera a deterioração da função motora enquanto inibe a eficácia do tratamento com levodopa em pacientes com DP (SANDYK, 1993). Desde então, muitos estudos estão sendo realizados a fim de investigar essa questão. As evidências indicam um aumento de 40% no risco de desenvolvimento da DP entre pessoas com DM e que em torno de 60% dos pacientes com DP têm a sinalização da insulina prejudicada e são intolerantes à glicose. Pacientes com DP também apresentaram diminuição dos receptores de insulina na SNpc (SANTIAGO; POTASHKIN, 2013a; LIMA et al., 2014). Mais recentemente foi realizada uma meta-análise de estudos coorte onde foi observado que a diabetes está associada a um aumento de risco para a DP (YUE et al., 2016). Estudos pré-clínicos demonstraram redução da liberação de DA no estriado e um aumento de deposição de ferro na SN em ratos diabéticos (MATTSON, 2014). Além disso, o comprometimento da sinalização de insulina, a disfunção mitocondrial, estresse do retículo endoplasmático, inflamação, desregulação do metabolismo de glicose, lipídeos e ceramidas são apontados como possíveis mecanismos em comum entre as duas doenças (SANTIAGO; POTASHKIN, 2014).

Nesse sentido, pesquisadores começaram a investigar possíveis alvos terapêuticos presentes na DM que pudessem ter utilidade na DP e vários estudos pré-clínicos tem demonstrado efeitos neuroprotetores de hipoglicemiantes como os agonistas do PPAR- γ (SWANSON et al., 2011; BARBIERO et al., 2014), agonistas do GLP-1 (HARKAVYI et al., 2008; BERTILSSON et al., 2008; KIM et al., 2009; LI et al., 2009) e inibidores DPP-4 (dipeptidil dipeptidase-4) (KOSARAJU et al., 2013; ABDELSALAM; SAFAR, 2015; MA et al., 2015; NASSAR et al., 2015).

2.2.1 Glucagon-like peptide (GLP-1)

O GLP-1 é um derivado do gene pro-glucagon, que contém o glucagon e os *glucagon-like peptides*, o GLP-1 e o GLP-2 (LARSEN; HOLST, 2005). Esse gene é expresso em vários tipos celulares incluindo numerosas células L endócrinas intestinais. A sua produção através das células intestinais ocorre em resposta principalmente à nutrientes provenientes da refeição, mas também por fatores neurais e endócrinos (BAGGIO; DRUCKER, 2007). Após atingirem a circulação sistêmica atuam em receptores GLP-1 presentes em vários órgãos, como o coração, estômago, fígado e principalmente no pâncreas aumentando a produção de insulina e diminuindo a produção de glucagon, considerado um importante regulador da homeostase da glicose, conforme pode ser visto na FIGURA 3. O GLP-1 também é capaz de atravessar a BHE e atua no cérebro aumentando a neuroproteção por mecanismos ainda não totalmente elucidados (BAGGIO; DRUCKER, 2007; PATEL; GHATE, 2014; ATHAUDA; FOLTYNIE, 2016).

FIGURA 3 – Efeitos do *glucagon-like peptide* (GLP-1) no organismo.

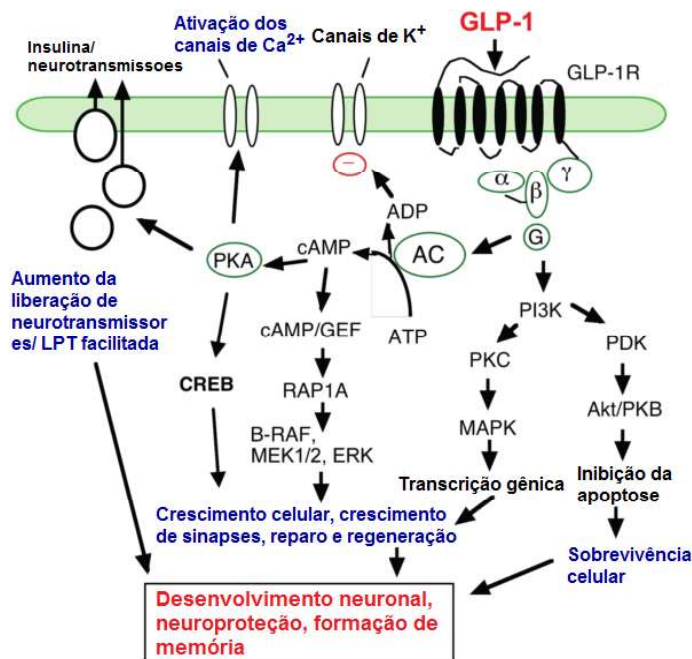


FONTE: PATEL; GHATE (2014).

Como pode ser observado na FIGURA 4, o mecanismo de neuroproteção proposto sugere que estimulação do receptor GLP-1 leva a um aumento do AMPc (adenosina 3',5'-monofosfato cíclico) intracelular, que ativa então PKA (proteína quinase A) e PI3K (fosfoinositídeo 3-quinase), que fosforilam e ativam uma variedade de vias de sinalização que podem ser divididas em quatro partes: MAPK/ERK, também conhecida como Ras-Raf-MEK-ERK (proteína-quinases ativadas por mitógeno regulada por sinal extracelular); a PI3K/AKT (proteína quinase B); a CREB (proteína de ligação ao elemento de resposta de AMPc); e finalmente a GEF (fatores de troca AMPc-guanina-nucleótido) que podem modular eventos intracelulares, tais como a ativação de canais de cálcio, aumento de expressão de peptídeos necessários para o crescimento, reparação e diferenciação de células neuronais, induzindo também a inibição da apoptose, inflamação e agregação de proteínas, todos esses fatores contribuindo para o aumento sobrevivência neuronal (HOLSCHER, 2010, 2014; ATHAUDA; FOLTYNIE, 2016).

Os receptores de GLP-1 são encontrados em maiores concentrações no hipotálamo e no tronco encefálico responsáveis pelo controle da alimentação, incluindo os núcleos para-ventriculares e arqueados do hipotálamo, bem como a área postrema, núcleo do trato solitário e núcleo motor dorsal do vago em macacos e essa distribuição é conservada em ratos. Com relação a áreas afetadas no modelo animal de DP, essa distribuição difere ligeiramente. Em macacos foi encontrado receptores GLP-1 em quantidade significativa na SN, VTA mas não no estriado (BLOEMENDAAL, VAN et al., 2014; HEPPNER et al., 2015). Enquanto isso, em ratos pouca quantidade de fibras de receptores GLP-1 encontram-se na SNpc e na VTA e uma quantidade significativa de RNAm foi encontrado no caudado-putâmen em ratos (MERCHENTHALER et al., 1999; GU et al., 2013).

FIGURA 4 – Vias envolvidas na ativação dos receptores GLP-1. A ativação do receptor GLP-1 ativa uma proteína G, que por sua vez ativa o sistema adenilil ciclase (AC). A subunidade G_{α} do receptor GLP-1 estimula a AC, o que leva a um aumento no AMPc intracelular e a ativação da proteína quinase A (PKA). A atividade da PKA aumenta a liberação de neurotransmissor sináptico e aumenta a plasticidade sináptica da neurotransmissão em neurônios. O ADP que também é produzido pela AC durante a produção de AMPc, atua em canais K^{+} sensíveis ao ATP, conduzindo a despolarização lenta das membranas celulares após o fechamento dos canais de K^{+} e uma redução da polarização da membrana neuronal. Isto pode aumentar a abertura dos canais de Ca^{2+} dependentes da voltagem e aumenta o Ca^{2+} citosólico, que por sua vez age como um segundo mensageiro. Um dos muitos efeitos que o aumento do Ca^{2+} citosólico pode ter é o aumento da liberação do transmissor. A ativação dos receptores GLP-1 também conduz a um aumento dos níveis de Ca^{2+} citosólicos como resultado da ativação de canais L dependentes de voltagem e, posteriormente, fosforilação de PKA e/ou mobilização de depósitos de Ca^{2+} intracelular. Um aumento nos níveis de fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) através da ativação da proteína G também pode ativar Ca^{2+} intracelular. O aumento dependente da proteína G nos níveis PI3K também ativa as MAPKs. Esta via ativa a expressão de genes, que controla a expressão de peptídeos que são necessários para o crescimento, reparação e diferenciação de células neuronais. A inibição de PI3K ou MAPK reduziu o crescimento de neuritos estimulado por GLP-1. A ativação mediada por GLP-1 de PI3K e fatores de transcrição regulam a expressão dos genes. AMPc ativa múltiplos sistemas de mensageiro intracelular via PDA ou independente da ativação de PKA. Foi descoberta uma via independente de PKA que envolve AMPc-GEFs. Os GEFs são ativados pela ligação ao AMPc e ativação de Rap1A. Rap1A ativa PKC e B-Raf, levando à ativação de MAPK.



FONTE: Adaptado de HOLSCHER (2014).

2.2.2 Agonistas GLP-1

Em modelos animais de doença de Alzheimer induzida por streptozotocina (LI et al., 2010) e em modelos animais da doença de Parkinson induzidos por MPTP (-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetra-hidropiridina) (KIM et al., 2009) e 6-OHDA (HARKAVYI et

al., 2008; BERTILSSON et al., 2008), foi observado que a exenatida, um agonista de GLP-1, tem potencial neuroprotetor, independente da homeostase da glicose (ATHAUDA; FOLTYNIE, 2016). A exenatida está atualmente sendo testada em ensaios clínicos devido às suas propriedades neuroprotetoras e já demonstrou em um pequeno estudo coorte a melhora das escalas motora e não motora da DP (AVILES-OLMOS et al., 2013).

Contrariamente, foi verificado em estudos utilizando agonistas de GLP-1 (lixisenatida e liraglutida) em modelos animais de DP induzido por MPTP e 6-OHDA que esses fármacos não foram capazes de atenuar a perda neuronal (LIU et al., 2015; HANSEN et al., 2016).

2.2.3 Dipeptidil peptidase-4 (DPP-4)

O GLP-1 é produzido pelo intestino através da alimentação e exerce seus efeitos em vários órgãos. No entanto, ele possui um tempo de meia vida curto (aproximadamente 2 minutos) devido a ação de uma enzima denominada dipeptidil peptidase 4 (DPP-4), a qual transforma o GLP-1 ativo em inativo, através de clivagem (BOULTON, 2016; GLORIE et al., 2016). Estima-se que mais de 50% do GLP-1 produzido pelas células intestinais são inativadas pela DPP-4 (BAGGIO; DRUCKER, 2007). Essa enzima, cliva seus substratos entre dois aminoácidos N-terminais a partir de peptídeos com uma prolina ou alanina na penúltima posição (KIM et al., 2014).

Além do GLP-1 existem mais de 30 substratos para a DPP-4 conhecidos até hoje, entretanto estudos sobre outros possíveis substratos são limitados (KIM et al., 2014). Entre seus substratos encontram-se citocinas, neuropeptídeos (PYY, NPY) e hormônios (GLP-1 e GIP) (MENTLEIN; KIEL, 1999; GLORIE et al., 2016).

A DPP-4, também conhecida como CD26, pertence à família das serina proteases e são responsáveis pela regulação vários processos biológicos relacionados a inflamação, ativação de células T, respostas imunes, regulação no crescimento, produção de citocinas e regulação da ação dos hormônios incretinas (MENTLEIN; KIEL, 1999).

2.2.4 Inibidores DPP-4

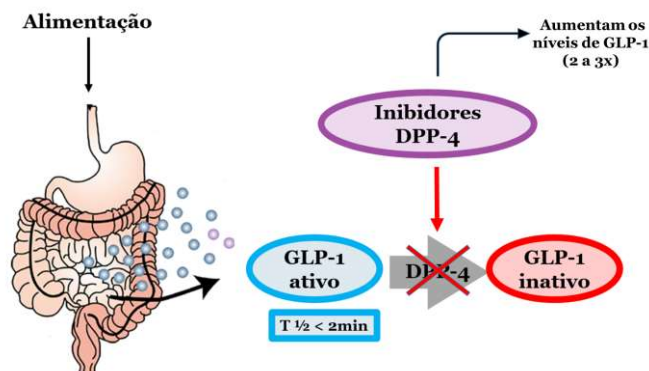
Os inibidores DPP-4 impedem a ação da DPP-4 aumentando os níveis de GLP-1 de 2 a 3 vezes como demonstrado na Figura 5. Os efeitos de eficácia dos inibidores DPP-4 para o tratamento de diabetes já foram bem documentados na literatura. Entretanto, como esses fármacos são relativamente novos no mercado (2006), a sua segurança a longo prazo ainda é inconclusiva. O uso de inibidores DPP-4 não está relacionado à hipoglicemia, mas casos de pancreatite e reações de hipersensibilidade foram relatados (KARAGIANNIS et al., 2014). Assim, como a enzima DPP-4 possui diversos substratos seus inibidores aumentam a quantidade de muitos peptídeos (KIM et al., 2014; WAGNER et al., 2015). Ademais, esses inibidores interagem com outras enzimas como a DPP-8 E DPP-9, porém a relevância clínica da inibidores DPP-4/8 e 9 ainda não é totalmente esclarecida (MERCHENTHALER et al., 1999; HUAN et al., 2015).

Como esses fármacos aumentam os níveis de GLP-1 no organismo, seus efeitos podem ser estendidos aos dos inibidores DPP-4, conforme observado no tratamento com a sitagliptina, que aumentou as concentrações de GLP-1 no plasma e no cérebro (GAULT et al., 2015). Além disso, os inibidores DPP-4 podem ter efeito neuroprotetor através da degradação de neuropeptídeos, estimulando o sistema imune por interações com adenosina desaminases, além da neuroproteção demonstrada pelos mecanismos de ação do GLP-1, mas esses mecanismos dos inibidores DPP-4 ainda não foram totalmente elucidados (SVENNINGSSON et al., 2016).

Estudos demonstram que os inibidores DPP-4 possuem propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes, antiapoptóticas e promovem a melhora do aprendizado, memória, depressão, do estresse oxidativo, e da função mitocondrial em modelos animais de DP, Alzheimer, Diabetes e Isquemia (PORTER et al., 2010; KOSARAJU et al., 2013; KIM et al., 2014; ABDELSALAM; SAFAR, 2015; GAULT et al., 2015; MA et al., 2015; KAMBLE et al., 2016). Da mesma forma, um estudo de 2016 observou uma redução da incidência da doença de Parkinson após o uso de inibidores DPP-4 (SVENNINGSSON et al., 2016).

Figura 5 – Mecanismo de ação dos inibidores DPP-4. O GLP-1 é produzido no intestino após a alimentação. No entanto, ele possui $T_{1/2}$ curto (aproximadamente 2 minutos) por ser degradado pela enzima DPP-4 que cliva o GLP-1, tornando-o inativo. Os fármacos inibidores DPP-4 impedem a ação dessa enzima, resultando no aumento dos níveis de GLP-1 de 2 a 3 vezes.

(Adaptado de Boulton *et al.*, 2016)



FONTE: Adaptado de Boulton *et al.* (2016).

2.2.5 Saxagliptina

A saxagliptina é um agente hipoglicemiante que atua inibindo a DPP-4, aumentando a secreção de insulina e reduzindo a degradação do GLP-1 endógeno. Esse fármaco proporciona várias vantagens em comparação com os agonistas de GLP-1 como a administração oral, efeito neutro no peso corporal e pouco risco de hipoglicemia e é 10 vezes mais potente que a vildagliptina e sitagliptina (LOTIFY *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2012; KARAGIANNIS *et al.*, 2014). Após a administração oral de saxagliptina, os níveis de GLP-1 aumentam 1,5 a 3 vezes (ALI, FONSECA, 2013).

Em humanos, roedores e cães a DPP plasmática é inibida mais que 95% pela saxagliptina. A saxagliptina possui um metabolito ativo, a 5-hidroxisaxagliptina, que está presente no plasma humano em níveis entre 2 à 7 vezes superiores à saxagliptina, apesar de ser 2 vezes menos potente do que a mesma (WANG *et al.*, 2012).

Estudos evidenciam uma neuroproteção da saxagliptina na doença de Alzheimer e na DP, assim como dos inibidores DPP-4, indicando que esse é um efeito potencial dessa classe farmacológica (KOSARAJU *et al.*, 2013; NASSAR *et al.*, 2015). Além disso, em um modelo animal de Alzheimer demonstrou efeito

neuroprotetor, reduziu déficits cognitivos e melhorou o aprendizado e memória (KOSARAJU et al., 2013).

Segundo Nassar et al. (2015) que avaliou os efeitos da saxagliptina em modelo animal da rotenona, verificou-se que a substância diminuiu neuroinflamação através da supressão da mieloperoxidase (MPO) e NF- κ B e seus efetores NF- α , iNOS e ICAM-1, diminuiu o estresse oxidativo, preveniu a perda dos neurônios dopaminérgicos via apoptose, inibiu o complexo I no estriado, melhorou a performance e coordenação motora, através da prevenção da perda neuronal na SNpc e no estriado (NASSAR et al., 2015).

Contudo, um estudo observou que a saxagliptina possui IC₅₀ baixo para DPP-8 (0.66 nM) e DPP-9 (<0.01 nM) se comparado com IC₅₀ DPP-4 (1.78 nM) e outras gliptinas (IC₅₀ > 10.000 para DPP-8 e 9) (HUAN et al., 2015). Consequentemente, a saxagliptina não é um fármaco altamente seletivo para DPP-4. Considerando que cada inibidor de DPP-4 possui seletividade diferente relativamente aos outros membros da DPP, a saxagliptina pode ter efeitos biológicos distintos. Inibidores seletivos da DPP-8/9 foram relacionados com graves toxicidades, por exemplo: alopecia, baço aumentado, e alterações histopatológicas em múltiplos órgãos em ratos (HUAN et al., 2015).

Deste modo, pode se verificar que ainda são necessários estudos que possam esclarecer os efeitos das drogas sensibilizadoras de insulina em modelos animais da doença de Parkinson.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito da Saxagliptina no modelo animal de DP induzido por 6-OHDA em ratos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar o efeito da saxagliptina na atividade motora dos animais tratados com 6-OHDA no teste do campo aberto e rotarod;
- Avaliar o efeito da saxagliptina na memória dos ratos tratados através do teste de reconhecimento de objetos.
- Analisar o efeito neuroprotetor da saxagliptina por meio de imunohistoquímica da tirosina hidroxilase (TH) nos ratos do grupo 6-OHDA.

4 ARTIGO CIENTÍFICO

Os materiais e métodos, resultados e discussão do trabalho encontram-se no artigo científico a seguir.

Ineffectiveness of saxagliptin as a neuroprotective drug in 6-OHDA-lesioned rats

Joelle de Melo Turnes Dunaiski¹, Taysa Bervian Bassani¹, Leonardo C. Souza¹, Maria A. B. F. Vital¹

¹Pharmacology Department, Biological Sciences Sector, Federal University of Paraná, Curitiba - PR - Brazil

_Corresponding author:

Maria Aparecida Barbato Frazão Vital

Departamento de Farmacologia

Universidade Federal do Paraná

Phone: +55 41 3361 1717

Fax: +55 41 3266-2042

Email: vital@ufpr.br

4.1 ABSTRACT

There is a growing interest in the investigation of a hypoglycemic agent for the treatment of Parkinson's disease (PD), because common mechanisms between PD and Diabetes Mellitus (DM) have been reported. In addition, several hypoglycemic drugs have showed potential neuroprotective effects. A class of these drugs is composed by the dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) inhibitors. Therefore, the present study investigated the effects of saxagliptin (DPP-4 inhibitor) in motor function using the open field (OFT) and rotarod tests. Moreover, cognition was evaluated using the novel object recognition test (NOR) in the animal model of PD induced by 6-hydroxydopamine (6-OHDA) in rats. Animals received a bilateral infusion of 6-OHDA in the substantia nigra (SN) and, after 24 hours, they started to receive treatment with Saxagliptin (1 mg/kg, p.o.) once daily, for 21 days. The nigrostriatal injury promoted a hypolocomotion in the OFT and rotarod, memory impairment in the NOR test and also a reduction of tyrosine hydroxylase immunoreactive (TH-ir) neurons. However, saxagliptin did not improve motor function and, surprisingly, the drug promoted cognitive decline. Therefore, our results indicate that treatment with saxagliptin was unable to reverse the impairment produced by 6-OHDA in the tests analyzed. Additionally, the drug worsened the memory of animals in this model. Thus, more studies are needed to elucidate the effects of these drugs in PD animal models and especially its effects in memory to clarify if differences between gliptins may result in distinct pharmacological effects or if these differences are relative to the particularity of this PD model.

Keywords: Parkinson's disease; GLP-1; dpp-4 inhibitors; Saxagliptin; novel object recognition test; 6-OHDA.

Abbreviations: 6-OHDA, 6-hydroxydopamine; ACSF, artificial cerebrospinal fluid; AD, Alzheimer's disease; d2, discrimination index; DA, dopamine; DM, Diabetes Mellitus; DPP-4, dipeptidyl peptidase-4; GLP-1, glucagon-like peptide; MPTP, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine; OFT, Open field test; NOR, novel object recognition test; PBS, phosphate-buffered saline; PD, Parkinson's Disease; ORP, overall rotarod performance; rotarod test; SN, substantia nigra; SNpc, substantia nigra pars compacta; TH, tyrosine hydroxylase; TH-ir, tyrosine hydroxylase immunoreactive

4.2 INTRODUCTION

Parkinson's disease (PD) is the second most frequent age-related neurodegenerative disease, afflicting about 1% of people over 65 years old. The disease is characterized by progressive loss of dopaminergic (DA) neurons in the substantia nigra pars compacta (SNpc), and the presence of Lewy bodies (GOEDERT et al., 2012). The loss of DA neurons result in severe striatal DA deficiency, which leads to the classical motor symptoms of PD (REKAIK et al., 2015). Additional neuronal systems, including noradrenergic and serotonergic, are also affected and could contribute to the non-motor features of the disease, such as cognitive impairments, mood disorders, sleep disturbances and autonomic dysfunction. These non-motor symptoms are responsible for the worsening of quality of life of patients. (SHIMIZU; OHNO, 2013). Although the exact mechanisms involved in the PD pathogenesis are still not entirely understood, many studies point out to the implication of several dysregulated interconnected cellular processes and molecular pathways (REKAIK et al., 2015). After 200 years since the first description of the characteristic symptoms of the disease, the current treatments still lack drugs that can prevent the disease's development or restore damaged dopaminergic neurons (SHIMIZU; OHNO, 2013). Consequently, intense research is focused on disease-modifying therapies (OERTEL; SCHULZ, 2016).

In 1960, discussions started about the possible links between Diabetes Mellitus (DM) and PD, and they are still not conclusive. Nonetheless, intensive emerging research has been made investigating this question (LIMA et al., 2014). The evidence indicate an increased risk for developing PD among people with type 2 diabetes (HU et al., 2007; XU et al., 2011). Cohort studies verified that 50-80% of PD patients have abnormal glucose tolerance (BOYD 3RD et al., 1971; LIPMAN et al., 1974). Coexistence of insulin receptors in the SNpc and dopaminergic neurons was observed (UNGER, J. et al., 1991; UNGER, J. W. et al., 1991). Furthermore, several dysregulated pathways concerning insulin, inflammation, endoplasmic reticulum stress, and mitochondrial are likely to play a role in the etiology and/or progression of both disorders (SANTIAGO; POTASHKIN, 2013b)

In this context, a glucagon-like peptide (GLP-1) is an incretin hormone produced by the intestine that act in the GLP-1 receptors and has hypoglycemic effects. Its agonists are currently utilized in the treatment of DM (HANSEN et al., 2016). GLP-1 receptors are expressed in a variety of brain areas in humans and rodents, including in the SNpc and the incretin hormone crosses the blood-brain barrier (NASSAR et al., 2015; ATHAUDA; FOLTYNIE, 2016). Growing evidence suggests that GLP-1 receptor stimulation are related with the activation of PI3K/AKT and MAPK/ERK pathway, which is involved in reduction of apoptosis, inflammation, oxidative stress, improvement of mitochondrial function, neuronal survival and regulation of uncontrolled autophagy resulting in neuroprotection (ATHAUDA; FOLTYNIE, 2016). Interestingly, all of these mechanisms are also dysregulated in PD.

The effects of GLP-1 agonists could be extended to DPP-4 inhibitors, since they elevate the levels of GLP-1. Accordingly, the DPP-4 inhibitors also have been studied (NASSAR et al., 2015) and demonstrated improvement of learning, memory (KOSARAJU et al., 2013; GAULT et al., 2015; JAIN; SHARMA, 2015) and neuroprotection (JIN et al., 2009; KOSARAJU et al., 2013; YANG et al., 2013; ABDELSALAM; SAFAR, 2015; MA et al., 2015; NASSAR et al., 2015) in animal models of Alzheimer, Parkinson, Diabetes and ischemia. Moreover, motor function improvement was seen in the rotenone model of PD (ABDELSALAM; SAFAR, 2015; NASSAR et al., 2015).

After oral administration of saxagliptin, GLP-1 levels rise up to 1.5 to 3 fold (ALI; FONSECA, 2013). Nassar (NASSAR et al., 2015) evaluated the treatment with saxagliptin (DPP-4 inhibitor) in a rotenone animal model of PD. This research demonstrated an improvement of motor function and neuroprotective, antioxidant, anti-inflammatory, anti-apoptotic properties that agree with the mechanisms of GLP-1 already discussed. Neuroprotective effects of saxagliptin and total reversal of cognitive deficits produced by streptozotocin animal model of AD was also observed (KOSARAJU et al., 2013).

Due to the promising results of stimulation of GLP-1 receptors and DPP-4 inhibitors in several animal models of neurodegenerative diseases, it is important to study the influence of drugs that act on the GLP-1 receptor. Moreover, only a few studies have investigated the effect of saxagliptin in animal models of PD. Thus, the aim of this work was to evaluate the motor, cognitive function and neuroprotective properties of saxagliptin in a 6-OHDA rat model of PD, in view of the importance of this subject for the discovery of more effective treatments for PD.

4.3 MATERIAL AND METHODS

4.3.1 Animals

Experiments were performed during the light phase of the day on adult Male Wistar rats weighing between 280-300 g. Before beginning any experimentation, the rats were allowed at least 1 week to acclimate to the environment and handling. The animals were randomly housed in groups of four in polypropylene cages with wood shavings as bedding and maintained in a 12 hours light-dark cycle and temperature-controlled room (22 ± 2 °C) with food and water *ad libitum*. All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used.

The Ethical Committee for Animal Use study (CEUA protocol # 925/2015) approved the procedures, which were conducted according to the guidelines of the Committee on Care and Use of Experimental Animals Resources.

4.3.2 Drugs

Saxagliptin (1 mg/kg, Bristol-Myers Squibb, Indiana, USA) was dissolved in 0.9% saline (vehicle). The dose of the drug was chosen based on previous studies that used animals models of neurodegenerative disorders and demonstrated its neuroprotective effect (KOSARAJU et al., 2013; NASSAR et al., 2015). Control rats were administered with vehicle. All treatments were administered orally (p.o.) by gavage once daily. The neurotoxin

6-OHDA (6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; Sigma, St. Louis, MO, USA) was dissolved in artificial cerebrospinal fluid (ACSF) supplemented with 0.2% ascorbic acid and it was infused into the SN through stereotaxic surgery for induction of the PD model.

4.3.3 Experimental design

The rats were randomly distributed into four groups: sham + saline, sham + saxagliptin, 6-OHDA + saline, 6-OHDA + saxagliptin (1mg/kg). Each rat was weighed at the beginning of the experimental protocol and every 3 days throughout the experiment. On the day -1, the rats were trained for the rotarod test and 24 hours later, submitted to stereotaxic surgery. The experimental groups received bilateral infusions of 6-OHDA in the SN and sham groups received bilateral infusions of ACSF. From the 1st to the 21st day, the rats were treated with saxagliptin (1 mg/kg) or saline (p.o) once daily, with the starting of the treatment 1 hour before the first open field test (OFT). The OFT and ORP were conducted on the 1st, 7th, 14th and 20th days. On the 20th and 21st day, the novel object recognition test NOR) was performed, training session and test session, respectively, and thereafter the animals were euthanized to perform the Immunohistochemistry staining for TH in the 21st day, as shown in Fig.1.

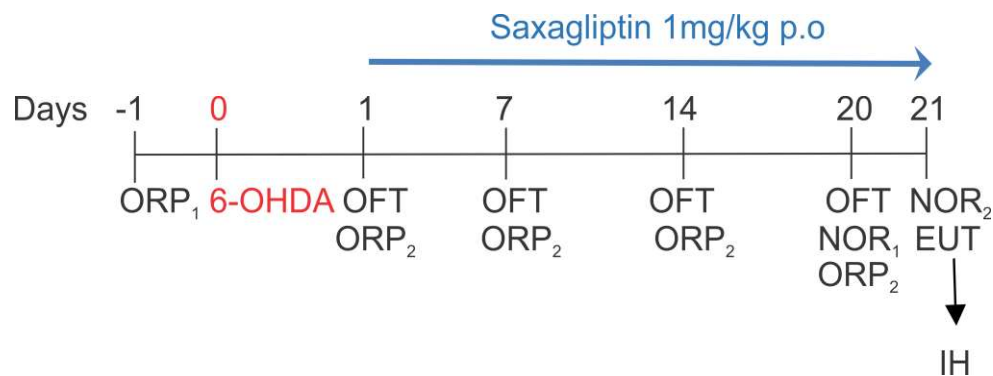


Fig. 6 Experimental design. Abbreviations used: 6-OHDA, 6-hydroxydopamine; EUT, euthanasia; IH, immunohistochemistry; OFT, open field test; ORP₁, overall rotarod performance (training session); ORP₂: overall rotarod performance (test session); NOR₁, novel object recognition test (training session); NOR₂, novel object recognition test (test session).

4.3.4 Stereotaxic surgery

General anesthesia was induced with 0.3 ml/kg equitiesin, i.p. The neurotoxin 6-OHDA (6 $\mu\text{g}/\text{l}$)

was prepared according to established doses that promote significant dopaminergic neuronal loss, similarly to advanced phases of PD (FERRO et al., 2005; LIMA et al., 2006; SANTIAGO et al., 2010, 2014). The surgery was conducted in the SN using a 27-gauge stainless-steel needle according to the following coordinates: anteroposterior (AP), - 5.0 mm from bregma; mediolateral (ML), \pm 2.1 mm from midline; dorsoventral (DV), - 8.0 mm from skull (PAXINOS; WATSON, 2005). The animals were mounted in a stereotaxic frame and received bilateral injections of 6-OHDA (experimental group) or ACSF (sham group) in total volume of 1 μ l, at a rate of 0.33 μ L/minute for 3 minutes. The injection needle was left in the injection site for an additional 2 minutes to avoid reflux.

4.3.5 Open field test

In order to evaluate motor alterations, the animals were placed individually in the center of the open field and were allowed to freely explore the area for 5 minutes (BASSANI et al., 2014). The open field apparatus consisted of a circular arena (97 cm diameter, 42 cm wall height) divided into three concentric circles and subdivided into 19 quadrants. Two motor parameters were quantified throughout this test: locomotion frequency (i.e., number of crossings from one quadrant to the other) and rearing frequency (i.e., number of times the animals stood on their hind paws). The open-field was cleaned with a 5% water-ethanol solution before behavioral testing to eliminate possible bias due to odors left by previous rats.

4.3.6 Rotarod test

The rats were evaluated for motor coordination and balance with the rotarod apparatus. An automated 4-lane rotarod unit connected to a fall detection system was used to assess the time of permanency on the lane. The rotarod unit consists of a rotating spindle and individual compartments 'lanes' for each rat. Initially, animals were trained to do the task by giving three sessions of 5-10 minutes each (5 r.p.m.) with a time of rest (50-60 minutes) between tests. After 48 hours of training, the rats were allowed to move over the rotarod (20 r.p.m.) and their falling time was recorded using a cutoff limit of 300 seconds. The rotarod protocol was adapted from Rozas and Labandeira García (ROZAS; LABANDEIRA GARCÍA, 1997).

4.3.7 Novel object recognition test

Object recognition memory which is a subtype of declarative memory was tested using a novel object recognition test (NOR) (COHEN; STACKMAN, 2015). The apparatus consisted of a dark square arena with the following measurements: 63 x 63 x 30 cm. The NOR test consisted of three phases: a habituation phase, a familiar object phase, and the novel object phase. In the first phase, the rats were exposed to the arena (for a period of 5 minutes) with no objects for habituation. After 24 hours, the animals were placed in the arena (for a period of 5 minutes) for a second habituation. The familiar object phase was performed 1 hour after the habituation phase. In this segment of the test, the rat was reintroduced into the arena, which contained two familiar objects for a period of 5 minutes. Finally, the novel object phase was performed 1 hour after the familiar object phase. In this phase, the rat was reintroduced to the arena which contained one familiar and one novel object for a period of 3 minutes (NEZHADI et al., 2016). Object exploration was defined as directing the nose to the object at a distance of no more than 2 cm and/or touching the object with the nose for at least 3 seconds. The novel object phase was recorded and the discrimination index (d2) was determined. The d2 was calculated according to the following equation: $d2 = (b - a)/(a + b)$, where the time spent exploring the familiar object and the novel object was represented as “a” and “b”, respectively (BRUIN, DE et al., 2011). This test was performed only in the 21st day to avoid bias from the motor dysfunction present in the beginning of the 6-OHDA model.

4.3.8 Immunohistochemistry staining for Tyrosine hydroxylase (TH)

Midbrain dopaminergic cells were assessed using a tyrosine hydroxylase (TH) immunohistochemical stain (REKSIDLER et al., 2007; SANTIAGO et al., 2010; BARBIERO et al., 2014). The animals were anesthetized with thiopental, followed by an intracardial infusion of saline and later by a 4% paraformaldehyde fixative solution. Subsequently, the brains were removed and immersed in a fixative solution for 1 day at 4 °C. The brains were then placed in a 30% sucrose solution for 3-4 days. A fast freezing with dry ice of the brains was performed. Several sections of 30 µm thickness were cut on a cryostat in the coronal plane covering about 360 µm (−4.92 to −5.28 from bregma) of the midbrain, covering the maximum extent of the dopaminergic neurons within the SNpc (PAXINOS; WATSON, 2005). The samples were placed on a plate with wells, and each well contained 4-7 sections of the brain from each animal. The slices were washed five times with a 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS) solution for 5 minutes each. Endogenous peroxidase was blocked with a H₂O₂ + distilled water solution for 10 minutes. The sections were washed again with 0.1 M PBS for 5 minutes, and the reaction was stopped with a blocking buffer (30 ml of 0.1 M PBS, 84 µl Triton X-100, and 450 µl normal goat serum). After blocking, the slices were incubated overnight in a solution that contained the primary antibody TH. In the next day, the sections were washed five times for 5 minutes each with 0.1 M PBS solution and subsequently incubated for 2 hours with the secondary antibody biotin at 4 °C. Subsequently, the slices were

washed again three times for 5 minutes each with 0.1 M PBS and then incubated in a solution of Complex AB (five drops of Reagent A, 30 ml of PBS + Triton, and 5 drops of Reagent B) for 2 hours at room temperature. The slices were washed again with 0.1 M PBS for 10 minutes, and the samples were incubated with DAB (3,3-diaminobenzidine) for 6-8 minutes. Finally, the slices were washed with 0.1 M PBS five times for 5 minutes each. The sections were mounted on gelatin-coated slides and dried for 48 hours. The slices were dehydrated in alcohol and cleared in xylene (5 minutes for each solution). The slides were then covered with entellan, coverslipped, and analyzed using an optical microscope (BX51 Olympus microscope, USA) with the capture software Cell[^]F (2008, Olympus Soft Imaging Solutions GmbH) by comparing the number of TH-positive cells in the SNpc in all groups. Photomicrographs of representative sections were taken at 100x magnification for each animal and digitized with a DP72 Olympus Optical digital camera. The mean total optical density was measured using ImageJ software and results were averaged for all slices from the animal (BARBIERO et al., 2014).

4.3.9 Statistics

Two-way ANOVA followed by Newman-Keuls post hoc test were performed to analyze the data from the open field test, rotarod test and body weight. The novel object recognition test and immunohistochemistry staining for tyrosine hydroxylase were analyzed using one-way ANOVA followed by Newman-Keuls post hoc test were performed. The statistical analyses were performed using GraphPad Prism, version 6.0. The error bars are reported as mean \pm SEM of the mean. Significance level was set at $P < 0.05$, except the object recognition test ($P = 0.0643$).

4.4 RESULTS

4.4.1 Body weight

Body weight was significantly decreased in the 6-OHDA groups from the 3rd to 18th day when compared with Sham + Saline group ($P < 0.0001$; Fig.2) as indicated by the group [F (3, 44) = 6.751; $P = 0.0008$], time [F (7, 308) = 54.50; $P < 0.0001$ and interaction [F (21, 308) = 4.413; $P < 0.0001$] factors ($n = 10-13$ /group).

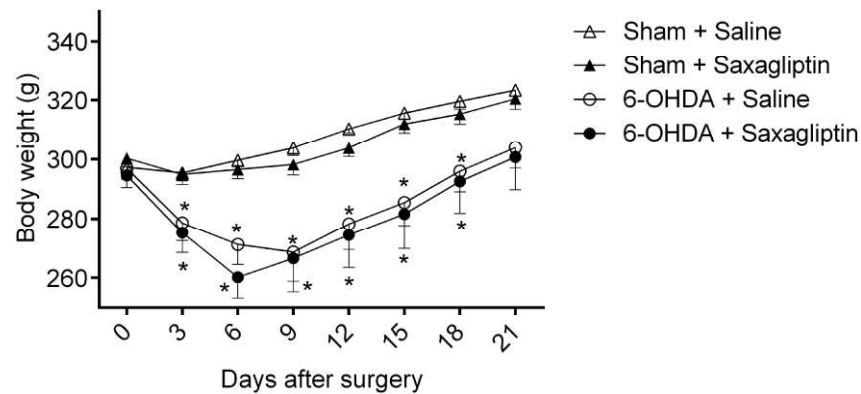


Fig. 7 Effect of treatment with saxagliptin on body weight. The data was expressed as mean \pm S.E.M.. * $P < 0.05$, compared to Sham + Saline (two-way ANOVA followed by post-hoc Newman-Keuls multiple comparisons test).

4.4.2 Open field test

Locomotion frequency was significantly decreased in the 6-OHDA groups on the 1st and 7th days when compared with Sham + Saline group ($P < 0.0001$; Fig.3a) as indicated by the group [$F(3, 41) = 7.892$; $P = 0.0003$], time [$F(3, 123) = 9.733$; $P < 0.0001$] and interaction [$F(9, 123) = 4.571$; $P < 0.0001$] factors ($n = 10$ -13/group). On the 14th day the 6-OHDA groups recovered from the surgery. However, on the 20th day 6-OHDA + Saline group of rats exhibited a decrease in locomotion frequency compared to Sham + Saxagliptin ($P < 0.01$). Rearing frequency was reduced in the 6-OHDA groups one day after the toxin infusion as demonstrated by group [$F(3, 41) = 3.557$; $P = 0.0223$], interaction [$F(9, 123) = 2.450$; $P = 0.0133$] and time [$F(3, 123) = 1.774$; $P = 0.1557$] factors. A recovery of the rats was observed on the 7th, 14th and 21st days, showing no significant statistic differences from the control (Fig.3b).

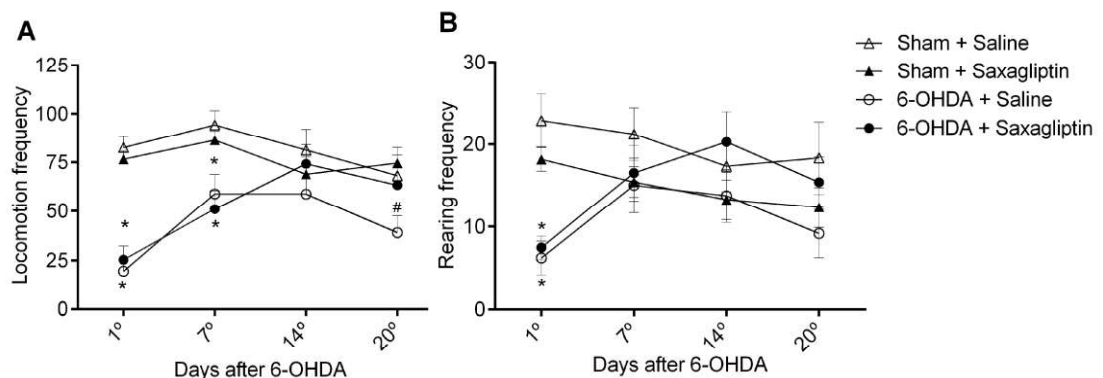


Fig. 8 Effect of treatment with saxagliptin on locomotor activity in the open field test. (a) Locomotion frequency. (b) Rearing frequency. The data was expressed as mean \pm S.E.M. * $P < 0.05$, compared to Sham + Saline; # $P < 0.05$, compared to Sham + Saxagliptin (two-way ANOVA followed by post-hoc Newman-Keuls multiple comparisons test).

4.4.3 Rotarod test

The infusion of 6-OHDA impaired the rotarod performance of the 6-OHDA groups one day after lesion ($P < 0.0001$). There were no significant improvements over time on the 7th, 14th and 21st days post-lesion, as indicated by group [$F(3, 40) = 24.63$; $P < 0.0001$], time [$F(3, 120) = 6.201$; $P = 0.0006$] and interaction [$F(9, 120) = 0.9372$; $P = 0.4957$] factors ($n = 10-13/\text{group}$). The treatment with Saxagliptin did not exhibit a significant improvement of latency to fall of the animals in this test (Fig.4).

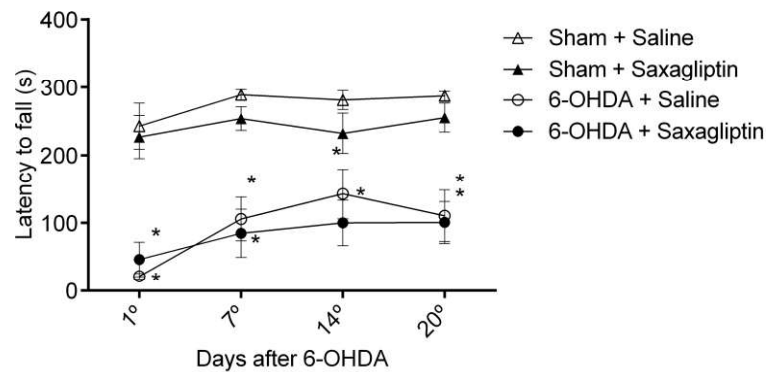


Fig. 9 Effect of treatment with saxagliptin on motor-learning in the rotarod test, after induction of the PD animal model with 6-OHDA. The data was expressed as mean \pm S.E.M. * $P < 0.05$, compared to Sham + Saline (two-way ANOVA followed by Newman-Keuls multiple comparisons test).

4.4.4 Novel object recognition test

In the test session, the 6-OHDA animals demonstrated a significant decrease in the discrimination index (d2). Interestingly, the Sham + saxagliptin group also showed an impaired memory, as observed in the reduced discrimination index [$F(3, 36) = 2.638$; $P = 0.0643$] (Fig.5) ($n = 8-13/\text{group}$).

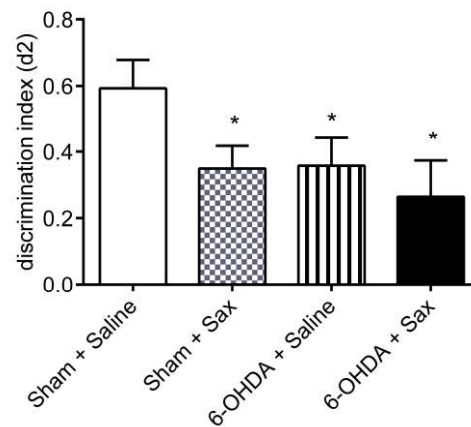


Fig. 10 Effect of treatment with saxaglipin on the discrimination index (d2) for the objects during the novel object recognition task. The data was expressed as mean \pm S.E.M. * $P = 0.06$, compared to Sham + Saline (one-way ANOVA followed by Newman-Keuls multiple comparisons test).

4.4.5 Immunohistochemistry staining for Tyrosine hydroxylase (TH)

The analysis of the TH-immunoreactive neurons in the SNpc revealed that 6-OHDA caused a pronounced neuronal loss, producing a reduction of 59%, compared to the Sham + Saline group [$F(3, 16) = 13.63$; $P = 0.0001$] ($n = 5/\text{group}$). Saxaglipin + Saline did not show signs of TH immunohistochemical staining alteration compared to Sham + Saline group. Chronic saxaglipin treatment was incapable in reverting the loss of the TH immunoreactivity of the SNpc neurons produced by 6-OHDA, which was not statistically different from the 6-OHDA + Saline group (Fig.6 and 7).

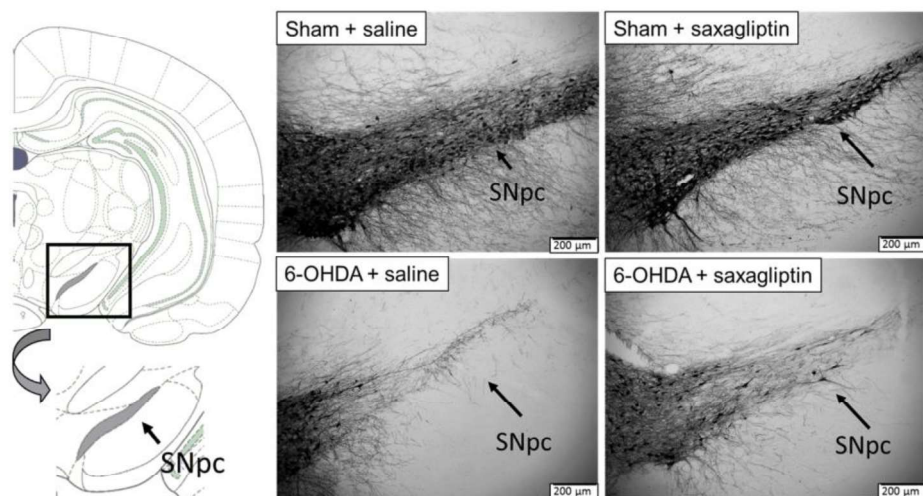


Fig. 11 Effect of treatment with saxaglipin in the loss of tyrosine hydroxylase immunoreactive (TH-ir) neurons in the SNpc of the rats. Photomicrographs of representative sections (TH-ir) neurons (100 \times magnification). The data are expressed as a percentage of the Sham + Saline group \pm S.E.M. * $P < 0.05$, compared with compared to Sham + Saline. (One-way ANOVA followed by Newman-Keuls test). The

schematic drawings were modified from the atlas: The rat brain in stereotaxic coordinates (PAXINOS; WATSON, 2005).

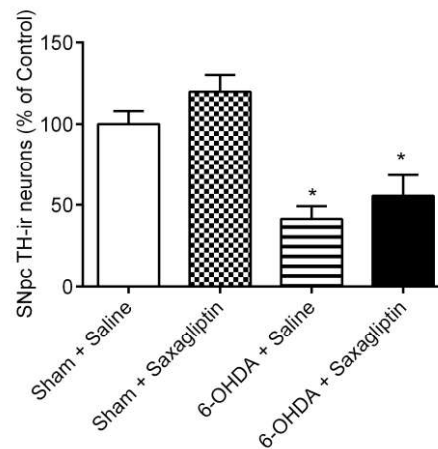


Fig. 12 Effect of treatment with saxagliptin in the percent loss of tyrosine hydroxylase immunoreactive (TH-ir) neurons in the SNpc. Quantification of TH-ir neurons in the SNpc in each group through optical density. The data are expressed as a percentage of the Sham + Saline group \pm S.E.M. ($n=5$ /group). * $P < 0.05$, compared with compared to Sham + Saline. (One-way ANOVA followed by Newman-Keuls test).

4.5 DISCUSSION

Our results showed that saxagliptin did not reverse the motor and cognitive impairment produced by the 6-OHDA model of PD and did not provide protection from the loss of DA neurons in the SNpc. On the contrary, a cognitive decline was observed in the sham-treated group in the NOR, indicating that saxagliptin could have a deleterious effect on memory. This is the first study evaluating the effects of saxagliptin treatment in a 6-OHDA animal model of PD.

Weight measures were performed every 3 days throughout the whole experiment and Saxagliptin + saline did not showed body weight difference compared to the Sham + Saline group. The 6-OHDA groups demonstrated weight loss consistent to the 6-OHDA model and the treatment with saxagliptin was not able to rescue it. Considering that DPP-4 inhibitors are weight neutral (SCHEEN, 2015), therefore, these results are consistent with the biological effects of the drug. Former experiments of our laboratory performed measurements of the levels of glucose in the blood of the animals with the PD model induced by 6-OHDA and were within normal ranges (data not shown). Demonstrating that the 6-OHDA model did not affect the levels of blood glucose.

In our study we observed a hypolocomotion of 6-OHDA groups in the OFT during the first week, with a recovery in the following days. This result was already reported as compensatory mechanisms observed in the PD model induced by 6-OHDA (BOVÉ; PERIER, 2012). A reduction of rearing frequency in the same group was observed. Moreover, in the ORP the rats presented a decline in motor coordination and balance throughout the entire experiment. ORP is considered a more sensitive method in detecting small lesions (MONVILLE et al., 2006) and it is poor for detecting minor improvements in performance (CARTER et al., 2001). Therefore, the

reduced latency to fall in the 6-OHDA groups could be expected during the experiment. Also, on 21st day, we observed a reduction in frequency of locomotion of 6-OHDA + Saline group compared to the Sham + Saxagliptin group. Additionally, a similar result was observed in our previous study (SANTIAGO et al., 2010), which demonstrated a tendency of reduction in the frequency of locomotion during the same time period as our experiment. This reduction could be attributed to the severe loss of TH-ir neurons of previous work conducted in our laboratory (about 50-60%). Treatment with saxagliptin did not improve the parameters evaluated in the OFT and rotarod test; as significant differences between 6-OHDA + Saxagliptin and 6-OHDA + Saline were not verified. Similar to our treatment regimen, Nassar (NASSAR et al., 2015) in the ORP demonstrated a prolonged latency to fall by 3 fold with Saxagliptin (1 mg/kg, p.o. for 21 days) comparing to the rotenone group and a reduction of 68% in the akinesia test on the last day of treatment. On the other hand, vildagliptin (2.5 mg/kg, p.o. for 21 days) in the rotenone model of PD, ameliorated the motor performance in the OFT and rotarod test (ABDELSALAM; SAFAR, 2015).

Surprisingly, our study demonstrated that saxagliptin produced an impairment of non-spatial memory. While in an AD model using saxagliptin as treatment, promoted memory retention in the hole board task and radial maze task (KOSARAJU et al., 2013). Mice with high a fat diet treated with sitagliptin showed an improvement in recognition memory (GAULT et al., 2015). Nonetheless, treatment with linagliptin in a mice obese model of type 2 diabetes demonstrated a cognitive improvement in the water maze test and passive avoidance test (MA et al., 2015).

Additionally, 6-OHDA infusion induced a loss of 59% of the TH-ir neurons in the SNpc, compared to sham, while Saxagliptin + 6-OHDA group did not significantly restored it. Therefore, treatment with saxagliptin did not show neuroprotective effects in this model of PD. In contrast, Nassar (NASSAR et al., 2015) induced a similar severity of TH loss (56%), demonstrated an enhancement of striatal TH of 1,7 fold compared to the 6-OHDA group.

Several studies demonstrated neuroprotection produced by DPP-4 inhibitors and GLP-1 agonists in various animal models of neurodegenerative diseases (ATHAUDA; FOLTYNIE, 2016). However, Hansen (HANSEN et al., 2016) observed the lack of neuroprotective effects of the liraglutide (GLP-1 agonist) in the rat 6-OHDA model of PD with partial and full nigral lesions, even though previous experiments showed the opposite with the same drug (HANSEN; GARTLEHNER, 2008).

The 6-OHDA model of PD was tested with most of drugs currently utilized in clinical practice while the rotenone model was only tested with L-DOPA and apomorphine (DUTY; JENNER, 2011). The 6-OHDA model is the neurotoxin *par excellence* to model PD and is considered a useful model for the development of therapeutic strategies (BOVÉ; PERIER, 2012). Our results indicated that saxagliptin had no effects on this animal model of PD induced by 6-OHDA, since it did not reverse any of the analyzed parameters in this study. On the contrary, Nassar (NASSAR et al., 2015) used the rotenone animal model of PD and observed that saxagliptin attenuated the loss of the dopaminergic neurons in the SNpc. Although, the duration of treatment and administration route of the drug were similar to ours, a different methodology regarding the animal model should be considered for the conflicting results.

Saxagliptin is a selective DPP-4 inhibitor and it is 10 times more potent than vildagliptin and sitagliptin (TELLA; RENDELL, 2015). There are more than 30 substrates known for DPP-4, and the study of possible other substrates is limited. The substrates reported includes hormones, chemokines and several neuropeptides;

such as substance P, neuropeptide Y, peptide YY, endomorphin-1 and endomorphin-2. Thus, the actions of these drugs might increase the levels of a variety of active peptides *in vivo* (KIM et al., 2014; WAGNER et al., 2015). On the other hand, DPP-4 inhibitors also interact with other dipeptidyl peptidases including DPP-8 and DPP-9 (SHUBROOK et al., 2011). Saxagliptin demonstrated a low IC_{50} to DPP-8 (0.66 nM) and DPP-9 (< 0.01 nM) comparing to DPP-4 (1.78 nM) and others gliptins ($IC_{50} > 10.000$ to DPP-8 and 9). However, clinical significance of this interaction is not clear (HUAN et al., 2015). Thus, considering that each DPP-4 inhibitor possesses different selectivity concerning the other DPP members, saxagliptin could have distinct biological effects. In fact, selective inhibitors of DPP-8/9 were related with severe toxicities, for example alopecia, enlarged spleen, multiorgan histopathological changes in a rat toxicity study (HUAN et al., 2015).

The DPP-4 inhibitors are a class of drugs relatively new in the market, being that the first drug was released in 2006 (sitagliptin) and as described before, the mechanisms of GLP-1 agonists, and, consequently, of DPP-4 inhibitors, are still being elucidated. Evidence demonstrates that GLP-1 receptor is involved in the PI3K/AKT and MAPK/ERK pathways with several neuroprotective actions similar to the effects of insulin in the brain. Moreover, its mechanisms implicate a possible increasing insulin sensitivity (ATHAUDA; FOLTYNIE, 2016). Actions of the DPP-4 inhibition of several substrates should also be considered as well in other dipeptidyl peptidases such as DPP-8 and DPP-9. Therefore, the total effects of the DPP-4 inhibitors should consider all of these factors and, unfortunately, they are not completely understood. Hence, the cognitive impairment showed in this study could indicate a possible adverse effect of saxagliptin in rats that could be useful for the treatment of post-traumatic stress.

The sitagliptin treatment in the high fat mice model demonstrated that DPP-4 inhibitors could significantly increase in GLP-1 levels in whole brain tissue, while DPP-4 activity was not modified. (GAULT et al., 2015). Assuming that saxagliptin, increases the levels of GLP-1 in the brain as well, the question is if there are enough GLP-1 receptors in the SNpc or striatum for significant biological effects in the model of PD. Few numbers of GLP-1 receptor fibers and diffused pre-pro-glucagon (a precursor of GLP-1) mRNA-expressing cells in the substantia nigra pars reticulata were found in rats. Whereas, significantly mRNA was found in the caudate-putamen (MERCHENTHALER et al., 1999; GU et al., 2013).

It should be stressed that only a few studies evaluated the effects of saxagliptin in animal models of PD for proper comparison and that the biological consequences of DPP-4 inhibitors are poorly understood. Thus, the impairment of memory demonstrated in this work should be further investigated.

4.6 CONCLUSION

The present study demonstrated that saxagliptin in the animal model of PD induced by 6-OHDA had no significant improvement on motor function, memory impairment and did not reverse the loss of dopaminergic neurons in the SNpc. Interestingly, saxagliptin impaired the memory of animals of sham group in the NOR test. The discrepancies seen between this and previous research could be due to differences between the gliptins and its pharmacological effects or that the particularity of PD models influenced these results. Further studies are needed to elucidate these questions.

4.7 ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from National Counsel of Technological and Scientific Development and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel. The funding agencies had no further role in the study design, collection, analysis, and interpretation of the data, writing the report, or on the decision to submit the paper for publication. MABFV is recipient of a National Counsel of Technological and Scientific Development fellowship. The authors report no conflicts of interest.

5 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que a saxagliptina no modelo animal de PD induzido por 6-OHDA não apresentou melhora significativa na função motora, na memória e não reverteu a perda de neurônios dopaminérgicos na SNpc. Além disso, a saxagliptina prejudicou a memória dos animais do grupo sham no teste de reconhecimento de objetos. As discrepâncias observadas entre nosso estudo e pesquisas anteriores poderiam ser devido a diferenças entre as gliptinas e seus efeitos farmacológicos ou que a particularidade dos modelos de doença de Parkinson influenciou esses resultados. Portanto, são necessários mais estudos para elucidar estas questões.

REFERÊNCIAS

- ABDELSALAM, R. M.; SAFAR, M. M. Neuroprotective effects of vildagliptin in rat rotenone Parkinson's disease model: Role of RAGE-NFkB and Nrf2-antioxidant signaling pathways. **Journal of Neurochemistry**, v. 133, n. 5, p. 700–707, 2015.
- ALI, S.; FONSECA, V. Saxagliptin overview: special focus on safety and adverse effects. **Expert opinion on drug safety**, v. 12, n. 1, p. 103–9, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23137182>>.
- ATHAUDA, D.; FOLTYNIE, T. The glucagon-like peptide 1 (GLP) receptor as a therapeutic target in Parkinson's disease: Mechanisms of action. **Drug Discovery Today**, v. 21, n. 5, p. 802–818, 2016. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2016.01.013>>.
- AVILES-OLMOS, I.; LIMOUSIN, P.; LEES, A.; FOLTYNIE, T. Parkinson's disease, insulin resistance and novel agents of neuroprotection. **Brain**, v. 136, n. 2, p. 374–384, 2013. Disponível em: <<http://www.brain.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/brain/aws009>>.
- BAGGIO, L. L.; DRUCKER, D. J. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. **Gastroenterology**, v. 132, n. 6, p. 2131–57, 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S001650850700580X>>. Acesso em: 15/7/2014.
- BARBIERO, J. K.; SANTIAGO, R.; TONIN, F. S.; et al. PPAR- α agonist fenofibrate protects against the damaging effects of MPTP in a rat model of Parkinson's disease. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 53, p. 35–44, 2014. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pnpbp.2014.02.009>>.
- BASSANI, T. B.; GRADOWSKI, R. W.; ZAMINELLI, T.; et al. Neuroprotective and antidepressant-like effects of melatonin in a rotenone-induced Parkinson's disease model in rats. **Brain research**, v. 1593, p. 95–105, 2014. Elsevier. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25301688>>.
- BERTILSSON, G.; PATRONE, C.; ZACHRISSON, O.; et al. Peptide hormone exendin-4 stimulates subventricular zone neurogenesis in the adult rodent brain and induces recovery in an animal model of parkinson's disease. **Journal of Neuroscience Research**, v. 86, n. 2, p. 326–338, 2008. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jnr.21483/abstract?systemMessage=Wiley+Online+Library+will+be+unavailable+on+Saturday+3rd+September+2016+at+08.30+BST/+03.30+EDT/+15.30+SGT+for+5+hours+and+Sunday+4th+September+at+10.00+BST/+05.00+EST/+17.00+SGT+>>>.
- BERTOLINO, G.; DUTRA SOUZA, H. C.; ARAUJO, J. E. DE. Neuropathology and behavioral impairments in Wistar rats with a 6-OHDA lesion in the substantia nigra compacta and exposure to a static magnetic field. **Electromagnetic Biology & Medicine**, v. 32, n. 4, p. 527–535, 2013. Disponível em: <10.3109/15368378.2012.751394%5Cnhttp://offcampus.lib.washington.edu/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=91967683&site=ehost-live>.
- BLOEMENDAAL, L. VAN; KULVE, J. S. TEN; FLEUR, S. E. LA; IJZERMAN, R. G.; DIAMANT, M. Effects of glucagon-like peptide 1 on appetite and body weight: Focus on the CNS. **Journal of Endocrinology**, v. 221, n. 1, 2014.
- BOULTON, D. W. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Saxagliptin, a Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitor. **Clinical Pharmacokinetics**, p. 1–14, 2016. Springer International Publishing. Disponível em: <<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L610775724>>.
- BOVÉ, J.; PERIER, C. Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 211, p. 51–76, 2012. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306452211012668>>.
- BOYD 3RD, A. E.; LEOVITZ, H. E.; FELDMAN, J. M. Endocrine function and glucose metabolism in patients with Parkinson's disease and their alternation by L-Dopa. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 33, n. 5, p. 829–837, 1971.

BRUIN, N. M. W. J. DE; PRICKAERTS, J.; LOEVEZIJN, A. VAN; et al. Two novel 5-HT₆ receptor antagonists ameliorate scopolamine-induced memory deficits in the object recognition and object location tasks in Wistar rats. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 96, n. 2, p. 392–402, 2011. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.nlm.2011.06.015>>.

CARTER, R. J.; MORTON, J.; DUNNETT, S. B. Motor coordination and balance in rodents. **Current protocols in neuroscience / editorial board, Jacqueline N. Crawley ... [et al.]**, v. Chapter 8, p. Unit 8.12, 2001.

COHEN, S. J.; STACKMAN, R. W. Assessing rodent hippocampal involvement in the novel object recognition task. A review. **Behavioural Brain Research**, v. 285, p. 105–117, 2015. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2014.08.002>>.

DAUER, W.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's Disease. **Neuron**, v. 39, n. 6, p. 889–909, 2003a.

DAUER, W.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's Disease: Mechanisms and Models. **Neuron**, v. 39, p. 889–909, 2003b.

DUTY, S.; JENNER, P. Animal models of Parkinson's disease: A source of novel treatments and clues to the cause of the disease. **British Journal of Pharmacology**, v. 164, n. 4, p. 1357–1391, 2011.

FERRO, M. M.; BELLISSIMO, M. I.; ANSELMO-FRANCI, J. A.; et al. Comparison of bilaterally 6-OHDA- and MPTP-lesioned rats as models of the early phase of Parkinson's disease: Histological, neurochemical, motor and memory alterations. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 148, n. 1, p. 78–87, 2005.

GAULT, V. A.; LENNOX, R.; FLATT, P. R. Sitagliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, improves recognition memory, oxidative stress and hippocampal neurogenesis and upregulates key genes involved in cognitive decline. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 17, n. 4, p. 403–413, 2015.

GLORIE, L.; D'HAESE, P. C.; VERHULST, A. Boning up on DPP4, DPP4 substrates, and DPP4-adipokine interactions: Logical reasoning and known facts about bone related effects of DPP4 inhibitors. **Bone**, v. 92, p. 37–49, 2016. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2016.08.009>>.

GOEDERT, M.; SPILLANTINI, M. G.; TREDICI, K. DEL; BRAAK, H. 100 years of Lewy pathology. **Nature Reviews Neurology**, v. 9, n. 1, p. 13–24, 2012. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrneurol.2012.242>>.

GU, G.; ROLAND, B.; TOMASELLI, K.; et al. Glucagon-like peptide-1 in the rat brain: distribution of expression and functional implication. **J Comp Neurol**, v. 521, n. 10, p. 2235–2261, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23238833>>.

HANSEN, H. H.; FABRICIUS, K.; BARKHOLT, P.; et al. Characterization of liraglutide, a glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor agonist, in rat partial and full nigral 6-hydroxydopamine lesion models of Parkinson's disease. **Brain Research**, v. 1, 2016. Elsevier. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006899316304000>>.

HANSEN, R.; GARTLEHNER, G. Efficacy and safety of donepezil, galantamine, and rivastigmine for the treatment of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. ... **Interventions in Aging**, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc2546466/>>.

HARKAVYI, A.; ABUIRMEILEH, A.; LEVER, R.; et al. Glucagon-like peptide 1 receptor stimulation reverses key deficits in distinct rodent models of Parkinson's disease. **Journal of neuroinflammation**, v. 5, p. 19, 2008.

HEPPNER, K. M.; KIRIGITI, M.; SECHER, A.; et al. Expression and distribution of glucagon-like peptide-1 receptor mRNA, protein and binding in the male nonhuman primate (macaca mulatta) brain. **Endocrinology**, v. 156, n. 1, p. 255–267, 2015.

HIRSCH, E. C.; VYAS, S.; HUNOT, S. Neuroinflammation in Parkinson's disease. **Parkinsonism &**

Related Disorders, v. 18, p. S210–S212, 2012. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1353802011700657>>.

HOLSCHER, C. Incretin analogues that have been developed to treat type 2 diabetes hold promise as a novel treatment strategy for Alzheimer's disease. **Recent patents on CNS drug discovery**, v. 5, n. 2, p. 109–17, 2010.

HOLSCHER, C. Central effects of GLP-1: new opportunities for treatments of neurodegenerative diseases. **Journal of Endocrinology**, v. 221, n. 1, p. T31–T41, 2014. Disponível em: <<http://joe.endocrinology-journals.org/cgi/doi/10.1530/JOE-13-0221>>.

HU, G.; JOUSILAHTI, P.; BIDEL, S.; ANTIKAINEN, R.; TUOMILEHTO, J. Type 2 Diabetes and the Risk of Parkinson's Disease. **Diabetes care**, v. 30, n. 4, p. 842–847, 2007.

HUAN, Y.; JIANG, Q.; LIU, J. LONG; SHEN, Z. FANG. Establishment of a dipeptidyl peptidases (DPP) 8/9 expressing cell model for evaluating the selectivity of DPP4 inhibitors. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 71, p. 8–12, 2015. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vascn.2014.11.002>>.

JAIN, S.; SHARMA, B. Neuroprotective effect of selective DPP-4 inhibitor in experimental vascular dementia. **Physiology and Behavior**, v. 152, p. 182–193, 2015. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2015.09.007>>.

JIN, H. Y.; LIU, W. J.; PARK, J. H.; BAEK, H. S.; PARK, T. S. Effect of Dipeptidyl Peptidase-IV (DPP-IV) Inhibitor (Vildagliptin) on Peripheral Nerves in Streptozotocin-induced Diabetic Rats. **Archives of Medical Research**, v. 40, n. 7, p. 536–544, 2009. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.arcmed.2009.09.005>>.

KALIA, L. V.; LANG, A. E. Parkinson's disease. **The Lancet**, v. 386, n. 9996, p. 896–912, 2015. Elsevier Ltd. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61393-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61393-3)>.

KALIA, L. V.; LANG, A. E. Parkinson disease in 2015: Evolving basic, pathological and clinical concepts in PD. **Nature reviews. Neurology**, p. 2–3, 2016. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrneurol.2015.249>><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26782330>>.

KAMBLE, M.; GUPTA, R.; REHAN, H. S.; GUPTA, L. K. Neurobehavioral effects of liraglutide and sitagliptin in experimental models. **European Journal of Pharmacology**, v. 774, p. 64–70, 2016.

KARAGIANNIS, T.; BOURA, P.; TSAPAS, A. Safety of dipeptidyl peptidase 4 inhibitors: a perspective review. **Therapeutic Advances in Drug Safety**, v. 5, n. 3, p. 138–146, 2014. Disponível em: <<http://taw.sagepub.com/lookup/doi/10.1177/2042098614523031>>.

KIM, N. H.; YU, T.; LEE, D. H. The nonglycemic actions of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

KIM, S.; MOON, M.; PARK, S. Exendin-4 protects dopaminergic neurons by inhibition of microglial activation and matrix metalloproteinase-3 expression in an animal model of Parkinson's disease. **Journal of Endocrinology**, v. 202, n. 3, p. 431–439, 2009.

KOSARAJU, J.; GALI, C. C.; KHATWAL, R. B.; et al. Saxagliptin: A dipeptidyl peptidase-4 inhibitor ameliorates streptozotocin induced Alzheimer's disease. **Neuropharmacology**, v. 72, p. 291–300, 2013. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.04.008>>.

LARSEN, P. J.; HOLST, J. J. Glucagon-related peptide 1 (GLP-1): Hormone and neurotransmitter. **Regulatory Peptides**, v. 128, n. 2, p. 97–107, 2005.

LEES, A. J.; HARDY, J.; REVESZ, T. Parkinson's disease. **The Lancet**, v. 373, n. 9680, p. 2055–2066, 2009. Elsevier Ltd. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60492-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60492-X)>.

LI, Y.; DUFFY, K. B.; OTTINGER, M. A.; et al. GLP-1 receptor stimulation reduces amyloid-beta peptide accumulation and cytotoxicity in cellular and animal models of Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's disease: JAD**, v. 19, n. 4, p. 1205–19, 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2948479&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 18/11/2015.

LI, Y.; PERRY, T.; KINDY, M. S.; et al. GLP-1 receptor stimulation preserves primary cortical and dopaminergic neurons in cellular and rodent models of stroke and Parkinsonism. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 4, p. 1285–1290, 2009.

LIMA, M. DE M. S.; BRAGA REKSIDLER, A.; MARQUES ZANATA, S.; et al. Different parkinsonism models produce a time-dependent induction of COX-2 in the substantia nigra of rats. **Brain Research**, v. 1101, n. 1, p. 117–125, 2006. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006899306013941>>.

LIMA, M. M. S.; TARGA, A. D. S.; NOSEDA, A. C. D.; et al. Does Parkinson's disease and type-2 diabetes mellitus present common pathophysiological mechanisms and treatments? **CNS & neurological disorders drug targets**, v. 13, n. 3, p. 418–428, 2014.

LINDGREN, H. S.; DUNNETT, S. B. Cognitive dysfunction and depression in Parkinson's disease: what can be learned from rodent models? **The European journal of neuroscience**, v. 35, n. 12, p. 1894–1907, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22708601>>.

LIPMAN, I. J.; BOYKIN, M. E.; FLORA, R. E. Glucose intolerance in parkinson's disease. **Journal of Chronic Diseases**, v. 27, n. 11–12, p. 573–579, 1974.

LIU, W.; JALEWA, J.; SHARMA, M.; et al. Neuroprotective effects of lixisenatide and liraglutide in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 303, p. 42–50, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306452215005953>>. Acesso em: 24/11/2015.

LOTIFY, M.; SINGH, J.; KALÁSZ, H.; TEKES, K.; ADEGHATE, E. Medicinal Chemistry and Applications of Incretins and DPP-4 Inhibitors in the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. **The open medicinal chemistry journal**, v. 5, n. Suppl 2, p. 82–92, 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3174521&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

MA, M.; HASEGAWA, Y.; KOIBUCHI, N.; et al. DPP-4 inhibition with linagliptin ameliorates cognitive impairment and brain atrophy induced by transient cerebral ischemia in type 2 diabetic mice. **Cardiovascular diabetology**, v. 14, p. 54, 2015. Cardiovascular Diabetology. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4458052&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

MATTSON, M. P. Interventions that improve body and brain bioenergetics for parkinson's disease risk reduction and therapy. **Journal of Parkinson's Disease**, v. 4, n. 1, p. 1–13, 2014.

MENTLEIN, R.; KIEL, D.-. Dipeptidyl-peptidase IV (CD26) -role in the inactivation of regulatory peptides. **World Wide Web Internet And Web Information Systems**, v. 85, p. 9–24, 1999.

MERCHENTHALER, I.; LANE, M.; SHUGHRUE, P. Distribution of pre-pro-glucagon and glucagon-like peptide-1 receptor messenger RNAs in the rat central nervous system. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 403, n. 2, p. 261–280, 1999. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19990111\)403:2%3C261::AID-CNE8%3E3.0.CO%5Cnhttp://2-5](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19990111)403:2%3C261::AID-CNE8%3E3.0.CO%5Cnhttp://2-5)>.

MEREDITH, G. E.; SONSALLA, Æ. P. K.; CHESSELET, M.; ALPHA-SYNUCLEIN, R. Á. L. P. S. Á. E. Á. Animal models of Parkinson ' s disease progression. , p. 385–398, 2008.

MONVILLE, C.; TORRES, E. M.; DUNNETT, S. B. Comparison of incremental and accelerating protocols of the rotarod test for the assessment of motor deficits in the 6-OHDA model. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 158, n. 2, p. 219–223, 2006. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165027006002895>>.

NASSAR, N. N.; AL-SHORBAGY, M. Y.; ARAB, H. H.; ABDALLAH, D. M. Saxagliptin: a novel antiparkinsonian approach. **Neuropharmacology**, v. 89, p. 308–17, 2015. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25446674>>.

NEZHADI, A.; SHEIBANI, V.; ESMAEILPOUR, K.; SHABANI, M.; ESMAEILI-MAHANI, S. Neurosteroid allopregnanolone attenuates cognitive dysfunctions in 6-OHDA-induced rat model of Parkinson's disease. **Behavioural Brain Research**, v. 305, p. 258–264, 2016. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2016.03.019>>.

OBESO, J. A.; RODRIGUEZ-OROZ, M. C.; GOETZ, C. G.; et al. Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle. **Nature Medicine**, v. 16, n. 6, p. 653–661, 2010. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nm.2165>>.

OERTEL, W.; SCHULZ, J. B. Current and experimental treatments of Parkinson disease: A guide for neuroscientists. **Journal of Neurochemistry**, p. 1–13, 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/jnc.13750>>.

PAGONABARRAGA, J.; KULISEVSKY, J. Cognitive impairment and dementia in Parkinson's disease. **Neurobiology of Disease**, v. 46, n. 3, p. 590–596, 2012. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2012.03.029>>.

PATEL, B. D.; GHATE, M. D. Recent approaches to medicinal chemistry and therapeutic potential of dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 74, p. 574–605, 2014. Elsevier Masson SAS. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S022352341300826X>>.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. 5th ed. san diego: academic press, 2005.

PORTER, D. W.; KERR, B. D.; FLATT, P. R.; HOLSCHER, C.; GAULT, V. A. Four weeks administration of Liraglutide improves memory and learning as well as glycaemic control in mice with high fat dietary-induced obesity and insulin resistance. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 12, n. 10, p. 891–899, 2010.

REICHMANN, H.; SCHNEIDER, C.; LÖHLE, M. Non-motor features of Parkinson's disease: depression and dementia. **Parkinsonism & Related Disorders**, v. 15, p. S87–S92, 2009. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1353802009707898>>.

REKAİK, H.; THÉ, F.-X. B. DE; PROCHIANTZ, A.; FUCHS, J.; JOSHI, R. L. Dissecting the role of Engrailed in adult dopaminergic neurons Insights into Parkinson disease pathogenesis. **FEBS Letters**, p. 1–9, 2015. Federation of European Biochemical Societies. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014579315008820>>.

REKSIDLER, A. B.; LIMA, M. M. S.; ZANATA, S. M.; et al. The COX-2 inhibitor parecoxib produces neuroprotective effects in MPTP-lesioned rats. **European journal of pharmacology**, v. 560, n. 2–3, p. 163–75, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17320073>>.

ROZAS, G.; LABANDEIRA GARCÍA, J. L. Drug-free evaluation of rat models of parkinsonism and nigral grafts using a new automated rotarod test. **Brain research**, v. 749, n. 2, p. 188–99, 1997. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006899396011626>>. Acesso em: 4/12/2015.

SANDYK, R. The relationship between diabetes mellitus and Parkinson's disease. **The International journal of neuroscience**, v. 69, n. 1–4, p. 125–30, 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8082998>>.

SANTIAGO, J. A.; POTASHKIN, J. A. Shared dysregulated pathways lead to Parkinson's disease and diabetes. **Trends in Molecular Medicine**, v. 19, n. 3, p. 176–186, 2013a. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2013.01.002>>.

SANTIAGO, J. A.; POTASHKIN, J. A. Shared dysregulated pathways lead to Parkinson's disease and diabetes. **Trends in Molecular Medicine**, v. 19, n. 3, p. 176–186, 2013b. Elsevier Ltd. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2013.01.002>>.

SANTIAGO, J. A.; POTASHKIN, J. A. System-based approaches to decode the molecular links in Parkinson's disease and diabetes. **Neurobiology of disease**, v. 72, p. 84–91, 2014. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0969996114000801>>.

SANTIAGO, R. M.; BARBIEIRO, J.; LIMA, M. M. S.; et al. Depressive-like behaviors alterations induced by intranigral MPTP, 6-OHDA, LPS and rotenone models of Parkinson's disease are predominantly associated with serotonin and dopamine. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 34, n. 6, p. 1104–1114, 2010. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278584610002216>>.

SANTIAGO, R. M.; BARBIERO, J.; GRADOWSKI, R. W.; et al. Induction of depressive-like behavior by intranigral 6-OHDA is directly correlated with deficits in striatal dopamine and hippocampal serotonin. **Behavioural Brain Research**, v. 259, p. 70–77, 2014. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166432813006505>>.

SANTIAGO, R. M.; TONIN, F. S.; BARBIERO, J.; et al. The nonsteroidal antiinflammatory drug piroxicam reverses the onset of depressive-like behavior in 6-OHDA animal model of Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 300, p. 246–253, 2015. IBRO. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.05.030>>.

SCHAPIRA, A. H. V. Molecular and clinical pathways to neuroprotection of dopaminergic drugs in Parkinson disease. **Neurology**, v. 72, n. 7 Suppl, p. S44-50, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19221314>>.

SCHEEN, A. J. A review of gliptins for 2014. **Expert opinion on pharmacotherapy**, v. 16, n. 1, p. 43–62, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25381751>>.

SCHINTU, N.; ZHANG, X.; SVENNINGSSON, P. Studies of Depression-Related States in Animal Models of Parkinsonism. **Journal of Parkinson's Disease**, v. 2, n. 2, p. 87–106, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3233/JPD-2012-12076>> <http://iospress.metapress.com.offcampus.dam.unito.it/content/8047276k71756463/fulltext.pdf> <http://iospress.metapress.com/content/8047276k71756463/?issue=2&genre=article&spage=87&issn=1877-7171&volume=2>.

SCHWARTING, R. K. W. UNILATERAL 6-HYDROXYDOPAMINE LESIONS OF MESO-STRIATAL DOPAMINE NEURONS AND THEIR PHYSIOLOGICAL SEQUELAE. , v. 49, 1996.

SCHWARTING, R. K. W.; HUSTON, J. P. The unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioral brain research. Analysis of functional deficits, recovery and treatments. **Progress in Neurobiology**, v. 50, p. 275–331, 1996.

SHIMIZU, S.; OHNO, Y. Improving the Treatment of Parkinson's Disease: A Novel Approach by Modulating 5-HT_{1A} Receptors. **Aging and disease**, v. 4, n. 1, p. 1–13, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3570136/>> http://www.mendeley.com/research/improving-treatment-parkinson-s-disease-novel-approach-modulating-5ht-1a-receptors/?utm_source=desktop&utm_medium=1.12.1&utm_campaign=open_catalog&userDocumentId=%257Bf19>.

SHUBROOK, J.; COLUCCI, R.; GUO, A.; SCHWARTZ, F. Saxagliptin: A selective DPP-4 inhibitor for the treatment of type 2 diabetes mellitus. **Clinical Medicine Insights: Endocrinology and Diabetes**, v. 4, p. 1–12, 2011.

SINGH, N.; PILLAY, V.; CHOONARA, Y. E. Advances in the treatment of Parkinson's disease. **Progress in Neurobiology**, v. 81, n. 1, p. 29–44, 2007. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301008206001511>>.

SOLARI, N.; BONITO-OLIVA, A.; FISONE, G.; BRAMBILLA, R. Understanding cognitive deficits in Parkinson's disease: lessons from preclinical animal models. **Learning & memory (Cold Spring Harbor**,

N.Y.), v. 20, n. 10, p. 592–600, 2013. Disponível em: <<http://learnmem.cshlp.org/content/20/10/592.full>>.

SVENNINGSSON, P.; WESTMAN, E.; BALLARD, C.; AARSLAND, D. Cognitive impairment in patients with Parkinson's disease: diagnosis, biomarkers, and treatment. **The Lancet Neurology**, v. 11, n. 8, p. 697–707, 2012. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1474442212701527>>.

SVENNINGSSON, P.; WIRDEFELDT, K.; YIN, L.; et al. Reduced incidence of Parkinson's disease after dipeptidyl peptidase-4 inhibitors-A nationwide case-control study. **Movement Disorders**, v. 0, n. 0, p. 6–7, 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/mds.26734>>.

SWANSON, C. R.; JOERS, V.; BONDARENKO, V.; et al. The PPAR- γ agonist pioglitazone modulates inflammation and induces neuroprotection in parkinsonian monkeys. **Journal of Neuroinflammation**, v. 8, n. 1, p. 91, 2011. BioMed Central Ltd. Disponível em: <<http://www.jneuroinflammation.com/content/8/1/91>>.

TELLA, S. H.; RENDELL, M. S. DPP-4 inhibitors: focus on safety. **Expert Opinion on Drug Safety**, v. 14, n. 1, p. 127–140, 2015. Disponível em: <<http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1517/14740338.2015.977863>>.

UNGER, J.; LIVINGSTON, J.; MOSS, A. Insulin receptors in the central nervous system: Localization, signalling mechanisms and functional aspects. **Progress in Neurobiology**, v. 36, n. 5, p. 343–362, 1991. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/030100829190015S>>.

UNGER, J. W.; MOSS, A. M.; LIVINGSTON, J. N. Immunohistochemical localization of insulin receptors and phosphotyrosine in the brainstem of the adult rat. **Neuroscience**, v. 42, n. 3, p. 853–861, 1991.

WAGNER, L.; KAESTNER, F.; WOLF, R.; et al. Identifying neuropeptide Y (NPY) as the main stress-related substrate of dipeptidyl peptidase 4 (DPP4) in blood circulation. **Neuropeptides**, v. 4, 2015. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.npep.2016.02.007>>.

WANG, A.; DORSO, C.; KOPCHO, L.; et al. Potency, selectivity and prolonged binding of saxagliptin to DPP4: maintenance of DPP4 inhibition by saxagliptin in vitro and ex vivo when compared to a rapidly-dissociating DPP4 inhibitor. **BMC pharmacology**, v. 12, n. 1, p. 2, 2012. BioMed Central Ltd. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3373380&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

WORTH, P. F. How to treat Parkinson's disease in 2013. , v. 13, n. 1, p. 93–97, 2013.

XU, Q.; PARK, Y.; HUANG, X.; et al. Diabetes and risk of Parkinson's disease. **Diabetes Care**, v. 34, n. 4, p. 910–915, 2011.

YANG, D.; NAKAJO, Y.; IIHARA, K.; KATAOKA, H.; YANAMOTO, H. Alogliptin, a dipeptidylpeptidase-4 inhibitor, for patients with diabetes mellitus type 2, induces tolerance to focal cerebral ischemia in non-diabetic, normal mice. **Brain Research**, v. 1517, p. 104–113, 2013. Elsevier. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2013.04.015>>.

YUE, X.; LI, H.; YAN, H.; et al. Risk of Parkinson Disease in Diabetes Mellitus: An Updated. **Medicine**, v. 95, n. 18, p. 1–8, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27149468>>.

ANEXO 1 – CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DA UFPR



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso de Animais
(CEUA)



Nº 925

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR), instituída pela Resolução Nº 86/11 do Conselho de Ensino Pesquisa e Extensão (CEPE), de 22 de dezembro de 2011, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA) estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal.

STATEMENT

The Ethics Committee for Animal Use from the Biological Sciences Section of the Federal University of Paraná (CEUA/BIO – UFPR), established by the Resolution Nº 86/11 of the Teaching Research and Extension Council (CEPE) on December 22nd 2011, **CERTIFIES** that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the Brazilian Guidelines for Care and Use of Animals for Scientific and Teaching purposes established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and with the international guidelines for animal experimentation.

PROCESSO/PROCESS: 23075.082858/2015-09

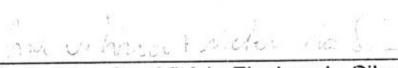
APROVADO/APPROVAL: 17/11/2015 – R.O. 12/2015

TÍTULO: Efeitos da saxagliptina em modelo animal de Doença de Parkinson induzido por 6-hidroxidopamina (6-OHDA) em ratos.

TITLE: Effects of saxagliptin in animal model of Parkinson's disease induced by 6-hydroxydopamine (6-OHDA) in rats.

AUTORES/AUTHORS: Maria aparecida Barbato Frazão Vital, Joelle de Melo Turnes, Taysa Bervian Bassani, Ronise Santiago.

DEPARTAMENTO/DEPARTMENT: Farmacologia


 Profa. Dra. Ana Vitória Fischer da Silva
 Coordenadora da CEUA